

AUS DEM INSTITUT FÜR HUMANGENETIK
DES KLINIKUMS
DER
JOHANN WOLFGANG GOETHE UNIVERSITÄT
FRANKFURT AM MAIN

(Leiter: Professor Dr. med. J. Švejcar) aus Kassel

QUALITATIVER NACHWEIS UND VERÄNDERUNG DER RELATIVEN
ZUSAMMENSETZUNG DER KOLLAGENTYPEN I UND III IN DER
MENSCHLICHEN LUNGE IN ABHÄNGIGKEIT IHRER ENTWICKLUNG
VON DER PSEUDOGLANDULÄREN PERIODE BIS ZUM 4. LEBENS-
MONAT

INAUGURAL-DISSERTATION

Zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
des Fachbereiches Humanmedizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

Vorgelegt von Sabine Menke
aus
Kassel

Frankfurt am Main
1987



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41550813_0020

Dekan : Prof. Dr. H. J. Müller
Referent : Prof. Dr. J. Švejcar
Koreferent : Prof. Dr. L. Träger

Tag der mündlichen Prüfung : 26.6.1987

Qualitativer Nachweis und Veränderung der relativen Zusammen-
setzung der Kollagentypen I und III in der menschlichen Lunge
in Abhängigkeit ihrer Entwicklung von der pseudoglandulären
Periode bis zum 4. Lebensmonat

Disposition :

1.	Danksagung		1
2.	Einleitung	2 -	35
2.1.	Aufgabenstellung		2
2.2.	Neuere Erkenntnisse über das Kollagen	3 -	25
2.2.1.	Die Polymorphie des Kollagens	3 -	4
2.2.2.	Die Kollagentypen	5 -	14
2.2.3.	Die Kollagenbiosynthese	15 -	25
2.3.	Die Entwicklung der menschlichen Lunge	26 -	35
2.3.1.	Die pränatale Entwicklung	26 -	32
2.3.1.1.	Die embryonale Periode (4.- 7. SSW)	26 -	27
2.3.1.2.	Die pseudoglanduläre Periode (8.-17. SSW)	28 -	29
2.3.1.3.	Die kanalikuläre Periode (18.-25. SSW)	29 -	31
2.3.1.4.	Die terminale Periode (26. SSW - Geb.)	31 -	32
2.3.2.	Die postnatale Lungenentwicklung	33 -	35
2.3.2.1.	Die alveoläre Periode (späte Fetalzeit - 8. Lj.)	33 -	35
3.	Untersuchungsobjekte und Unter- suchungsmethode	36 -	58
3.1.	Die Bestimmung des wahrscheinlichen Gestationsalters der Feten	36 -	43
3.2.	Die Untersuchungsobjekte	44 -	48
3.2.1.	Die Untersuchungsobjekte der pseudo- glandulären Periode		45
3.2.2.	Die Untersuchungsobjekte der kanali- kulären Periode		46
3.2.3.	Die Untersuchungsobjekte der termina- len Periode	47 -	48
3.2.4.	Die Untersuchungsobjekte der alveo- lären Periode		48

3.3.	Die Verwendung des Untersuchungsmaterials	49
3.4.	Die Präparation des Lungengewebes	49
3.5.	Die Aufbereitung des Untersuchungsmaterials für die weitere Bearbeitung	50 - 51
3.5.1.	Die Trocknung der Proben	50
3.5.2.	Die Hydroxyprolinbestimmung	50 - 51
3.6.	Die Kollagenspaltung durch Pepsinverdauung und Salzfällung	52 - 53
3.7.	Die Isolierung der Kollagentypen I und III durch Pepsinverdauung und Salzfällung	54 - 55
3.8.	Weitere Verfahren zur qualitativen und quantitativen Erfassung der Kollagentypen I und III in der fetalen Lunge	56 - 58
3.8.1.	Die Cyanogenbromid-Spaltung	56 - 57
3.8.2.	Die Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese und die Densitometrie	57 - 58
4.	Die Arbeitsergebnisse	59 - 137
4.1.	Der Kollagengehalt des Ausgangsmaterials	59 - 63
4.2.	Das Verhalten der Proben nach Kollagenanreicherung und Kollagenspaltung	64 - 102
4.3.	Das Verhalten der Proben nach Kollagenanreicherung und Isolierung der Kollagentypen I und III	103 - 137
5.	Diskussion der Ergebnisse	138 - 168
5.1.	Die Ergebnisse der Kollagenspaltung ohne Isolierung und getrennte Darstellung der Kollagentypen I und III in Abhängigkeit von den Entwicklungsperioden der Lunge	138 - 151
5.1.1.	Die Untersuchungsergebnisse in der pseudoglandulären Periode der Lungenentwicklung	138
5.1.2.	Die Untersuchungsergebnisse in der kanalikulären Periode der Lungenentwicklung	138 - 141
5.1.3.	Die Untersuchungsergebnisse in der terminalen Periode der Lungenentwicklung	142 - 143

5.1.4.	Die Untersuchungsergebnisse in der alveolären Periode der Lungenentwicklung	143 - 144
5.1.5.	Vergleichende Darstellung der Ergebnisse, Elektrophoresen und Densitogramme in Abhängigkeit vom Gestationsalter	144 - 151
5.2.	Die Ergebnisse der Kollagenspaltung und Isolierung der Kollagentypen I und III in Abhängigkeit von den Entwicklungsperioden der Lunge	151
5.2.1.	Das Untersuchungsergebnis in der kanalikulären Periode der Lungenentwicklung	152 - 153
5.2.2.	Die Untersuchungsergebnisse in der terminalen Periode der Lungenentwicklung	153 - 154
5.2.3.	Die Untersuchungsergebnisse in der alveolären Periode der Lungenentwicklung	155 - 156
5.2.4.	Vergleichende Darstellung der Ergebnisse, Elektrophoresen und Densitogramme in Abhängigkeit vom Gestationsalter	156 - 168
6.	Zusammenfassung und abschließende Beurteilung	169 - 175
7.	Literaturverzeichnis	176 - 219

Lebenslauf

Ehrenwörtliche Erklärung

1. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. med. Švejcar für die Überlassung des Dissertationsthemas bedanken. Seine freundliche Unterstützung und Betreuung gaben mir wertvolle Anregungen während der Planung, Gestaltung und Durchführung der vorliegenden Arbeit. Die mit ihm geführten Diskussionen trugen wesentlich zur Vollendung bei.

Ebenso gilt mein Dank der medizinisch-technischen Assistentin Frau Mohrmann. Unter ihrer Anleitung und Aufsicht war es mir möglich, in kurzer Zeit die Methoden der Typenisolierung des Kollagens in Typ I und Typ III sowie die Gesamtdarstellung der Kollagentypen zu erlernen. Freundlicherweise wurden von Frau Mohrmann Gel-Elektrophorese und Densitometrie übernommen, so daß die isolierten Typen nachgewiesen und das Ergebnis abgesichert werden konnte.

Frau Rehfeld übernahm die photographische Darstellung der Elektrophoresen und Densitogramme. Dafür möchte ich mich bedanken. Herrn Chefarzt Professor Dr. med. Hübner und seinen Mitarbeitern vom Pathologischen Institut danke ich für ihre Unterstützung bei der Gewinnung von geeigneten Untersuchungsmaterials sowie für die Bereitstellung der dazugehörigen Dokumentation.

Danken möchte ich auch dem Chefarzt der Universitäts-Frauenklinik, Herrn Professor Dr. med. Schmidt-Matthiesen, sowie seinen Mitarbeitern Herrn Dr. med. Becker und Frau Lahnert vom histologischen Labor, die mir zahlreiche Proben zur Verfügung stellten.

Ohne die Unterstützung von ihnen wäre die Anfertigung der vorliegenden Arbeit nicht möglich gewesen.

2. Einleitung

2.1 Aufgabenstellung

Seit 1961 ist die Zahl der Veröffentlichungen über Struktur, Synthese und Funktion des Kollagens ständig gestiegen. Verbesserte Extraktions- und Nachweismethoden ermöglichen heute die Beschreibung der Kollagenzusammensetzung auch in schwer löslichen Geweben.

Nach LAST und REISER (154) und anderen Autoren (125, 133, 238) können weniger als 20% des gesamten Kollagens der adulten Lunge mit aggressiven Extraktionsmethoden als intakte Kollagenketten gelöst werden. Die extreme Unlöslichkeit des Kollagens hat mich veranlaßt, meine Untersuchungen an der fetalen Lunge sowie den Lungen von Neugeborenen und Säuglingen durchzuführen. Das Fehlen kovalenter intermolekularer Querverbindungen im Kollagen junger Tiere ermöglicht die Aufklärung struktureller Untereinheiten (125). Da das gleiche für fetales menschliches Kollagen gilt, wird es in der vorliegenden Arbeit ausgenutzt. Kollagene sind die wichtigsten strukturellen Bestandteile extrazellulärer Matrix. Bisher konnten 11 verschiedene Kollagentypen mit 19 Ketten identifiziert werden (47, 186).

Als wichtigstes Strukturprotein der Lunge war es möglich, drei Kollagentypen im Lungenparenchym, Typ-II-Kollagen in Trachealknorpel und großen Bronchien sowie Typ-IV-Kollagen aus den Basalmembranen zu extrahieren.

Da Typ I- und III-Kollagen mehr als 95% des gesamten Lungenparenchymkollagens bilden (154), habe ich mich auf die Untersuchung dieser beiden Kollagentypen beschränkt.

In der vorliegenden Arbeit wird der Gehalt der Kollagentypen I und III in fetalem und postnatalem Lungengewebe untersucht und ihr Verhältnis zueinander dargestellt. Die gewonnenen Ergebnisse werden in Abhängigkeit zur fetalen Lungenentwicklung diskutiert.

2.2. Neuere Erkenntnisse über das Kollagen

2.2.1. Die Polymorphie des Kollagen (145, 176, 204, 205, 217)

Kollagene als heterogene Gruppe extrazellulärer Proteine werden durch einheitliche Aminosäuresequenzen charakterisiert. Diese bestehen zu 30% aus Glycin, zu 20% aus Prolin und Hydroxyprolin und zu einem variablen Anteil aus Hydroxylysinen und Carbohydraten (217). Eine Polypeptidkette - auch α -Kette genannt - besteht aus annähernd 1000 Aminosäureresten. Der relativ hohe Gehalt an Iminosäureresten und die charakteristische Verteilung des Glycins als $(X - Y - Gly)_n$ in den α -Ketten determiniert die Faltung der Ketten zu einer linksdrehenden Helix mit einem Durchmesser von 0,95 nm und drei Aminosäureresten pro Windung. Die folgende Abbildung verdeutlicht die Aminosäuresequenz in einem kleinen Ausschnitt einer α -Kette.

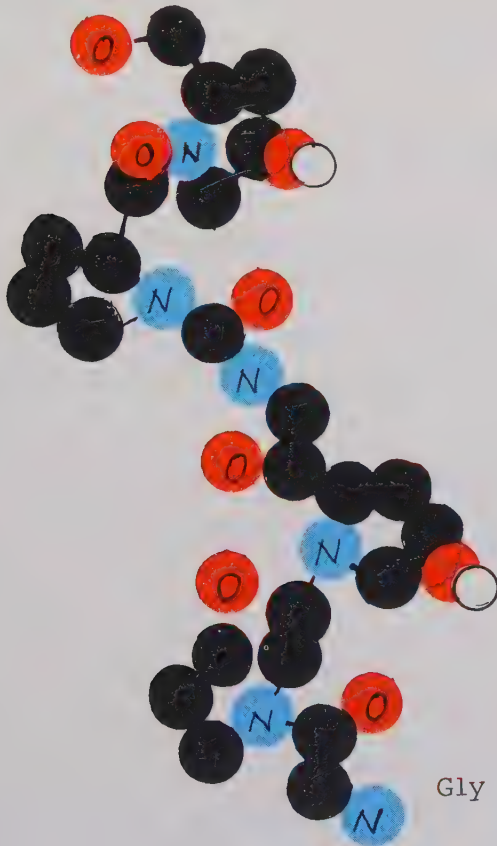


Abb.1 Modell der Raumstruktur einer α -Helix (Autor)

Drei in sich linksgewundene α -Ketten werden in eine rechtsdrehende Superhelix umeinander gewunden. Es entsteht ein stabförmiges, starres, tripelhelikales Molekül mit einem Durchmesser von 1,5 nm und einer Länge von ca. 300 nm. Dabei wird die Stabilität der Tripelhelix durch die starren zyklischen Aminosäuren Prolin und Hydroxyprolin bewirkt, da sie die Rotation der Polypeptidketten begrenzen. Andere Aminosäuren verringern die Stabilität der Helix, sind aber für die Zusammenlagerung tripelhelikaler Moleküle zu Kollagenfibrillen bedeutsam.

Nach der Umwandlung von Prokollagen in Kollagen kommt es zur Vernetzung der Kollageneinheiten. Dabei müssen zwei Arten der Vernetzung unterschieden werden:

1. intramolekulare Vernetzungen :

Sie werden zwischen zwei Aldehydresten benachbarter α -Ketten in einem einzigen Kollagenmolekül ausgebildet.

2. intermolekulare Vernetzungen :

Sie werden zwischen zwei Aldehydresten von einem tripelhelikalen Molekül und den ϵ -Aminogruppen spezifischer Lysin- oder Hydroxylysinresten einer zweiten Kollagenhelix gebildet.

Art und Ausmaß der Quervernetzungen variieren mit der physiologischen Funktion und dem Alter des jeweiligen Gewebes.

2.2.2. Die Kollagentypen

Bisher konnten 11 genetisch verschiedene Kollagentypen identifiziert und nachgewiesen werden. Sie zeigen Unterschiede in :

1. ihrer Primärstruktur, die von der Nukleotidsequenz ihrer mRNA, d.h. von der genetischen Information abhängig ist, die von den DNA-Sequenzen codiert wurde ;
2. in der Varianz des umfangreichen Ablaufes der post-translationalen Modifikationen und
3. in der Länge ihrer nicht unterbrochenen helikalen Molekülabschnitte bzw. des relativen Molekulargewichtes ihrer Polypeptidketten.

Die folgende Tabelle zeigt die Kollagentypen, ihre Kettenzusammensetzung sowie ihr Vorkommen im Gewebe.

Kollagentyp	Kettenzusammensetzung	Auftreten im Gewebe
I	$[\alpha 1(I)]_2 \alpha 2(I)$	Dermis, Pulmo, Ossa, Placenta, Arterien
I (Trimer)	$[\alpha 1(I)]_3$	Dermis, Hepar, Sehne, Dentin, Fibroblasten Tumore
II	$[\alpha 1(II)]_3$	Knorpel, Discus intervertebralis, Chondrosarkom
III	$[\alpha 1(III)]_3$	Dermis, Pulmo, Uterus, Chorionamnion, Hepar
IV	$[\alpha 1(IV)]_2 \alpha 2(IV)$	Basalmembranen

Kollagentyp	Kettenzusammensetzung	Auftreten im Gewebe
V	$\left[\begin{array}{l} \alpha 1(V) \\ \alpha 1(V) \\ \alpha 1(V) \end{array} \right]_2 \alpha 2(V) \alpha 3(V)$	Dermis, Placenta, Basalmembranen, Chorionamnion, Rhabdo- myosarkom
VI	unbekannt Ketten : $\alpha 1(VI)$ $\alpha 2(VI)$ $\alpha 3(VI)$	Uterus, Pulmo, Dermis, Ren, Ligamente, Blut- gefäße
VII	$\left[\alpha 1(VII) \right]_3$	Dermis, Oesophagus, Chorionamnionmembran
VIII	Ketten : $\alpha 1(VIII)$ ungenau; Kassettenstruktur, gebildet aus Kolla- genpolypeptiden	Kulturmedien endo- thelialer, astrozy- tärer oder anderer Zellen normaler oder maligner Zellen
IX	$\left[\alpha 1(IX) \alpha 2(IX) \alpha 3(IX) \right]$	Knorpel, Discus intervertebralis
X	$\left[\alpha 1(X) \right]_3$	Knorpel
XI	($1 \alpha 2 \alpha 3 \alpha$)	Knorpel, Discus intervertebralis

Tab. 1 Die Kollagentypen, ihre Kettenzusammensetzung und ihr Vorkommen im Gewebe
aus: CHEAH, K. (47)

Nach MILLER (186) können die bekannten Kollagentypen in drei Gruppen unterteilt werden.

1. Gruppe :

Sie beinhaltet Moleküle, die aus Ketten mit einem mittleren relativen Molekulargewicht von 95.000 oder mehr gebildet werden und deren nicht unterbrochene helikale Region eine Länge

von ca. 300 nm besitzt. Diese Kollagene zeigen folgende chemische und strukturelle Eigenschaften :

1. mittleres relatives Molekulargewicht der Ketten -
es wird aus individuellen Molekülen gebildet, die zur Konstruktion funktioneller Proteinaggregate gebraucht werden;
2. molekulare Arten der Kettenzusammensetzung und
3. Bilden von Aggregaten durch verschiedene Moleküle.

Tab. 2 zeigt die Kollagene dieser Gruppe, ihr relatives Kettenmolekulargewicht, ihre Kettenzusammensetzung sowie die Art ihrer Aggregate.

Kollagentyp	rel. Molekulargew. d. Ketten	Kettenkomposition	Form der Aggregate
I	95.000	$\left[\begin{matrix} \alpha 1(I) \\ \alpha 1(I) \end{matrix} \right]_2 \alpha 2$ $\left[\alpha 1(I) \right]_3$	Fiber
II	95.000	$\left[\alpha 1(II) \right]_3$	Fiber-Fibrillen
III	110.000-95.000	$\left[\alpha 1(III) \right]_3$	retikuläres Netzwerk
V	200.000-130.000	$\left[\begin{matrix} \alpha 1(V) \\ \alpha 1(V) \\ \alpha 1(V) \\ \alpha 2(V) \end{matrix} \right]_2 \alpha 2$ $\left[\alpha 1(V) \right]_3$ $\alpha 3(V)$	Aggregate unbekannter Struktur in perizellulären und perifibrillären Regionen
XI	?	($1\alpha 2\alpha 3\alpha$)	Aggregate unbekannter Struktur in Chondrozyten

Tab. 2 Die Kollagentypen der Gruppe 1, ihr mittleres relatives Molekulargewicht, ihre Kettenkomposition und die Form ihrer Aggregatbildung.
aus: MILLER, E. (186)

2. Gruppe :

Die Moleküle dieser Kollagene Bestehen aus Ketten, die eine Länge von 300 nm und mehr haben und die ein mittleres relatives Molekulargewicht von 95.000 und mehr besitzen. Im Gegensatz zu den Ketten der Gruppe 1 - Moleküle ist hier die helikale Region unterbrochen.

In diese Gruppe gehören folgende Kollagentypen (Tab. 3)

Kollagentyp	rel. Molekulargew. d. Ketten	Kettenkomposition	Form der Aggregate
IV	185.000-170.000	$\left[\begin{array}{l} \alpha 1(\text{IV}) \\ \alpha 1(\text{IV}) \\ \alpha 2(\text{IV}) \\ \text{RC}(\text{IV}) \end{array} \right]_3^2 \alpha 2$	offene, maschenartige Aggregate der Basalmembranen
VI	240.000-140.000	Ketten : $\alpha 1(\text{VI})$ $\alpha 2(\text{VI})$ $\alpha 3(\text{VI})$	mikrofibrilläre Elemente
VII	>170.000	$\left[\alpha 1(\text{VII}) \right]_3$	?
VIII	180.000-100.000	Kette : $\alpha 1(\text{VIII})$	?

Tab. 3 Die Kollagentypen der Gruppe 2, ihr mittleres relatives Molekulargewicht, ihre Kettenkomposition und die Form ihrer Aggregatbildung.
aus: MILLER, E. (186)

3. Gruppe :

In diese Gruppe fallen relativ kurze Moleküle, bei denen die helikale Region fortlaufend oder unterbrochen sein kann. Diese Bedingungen treffen nur für zwei Kollagentypen, Typ IX und Typ X, zu. Die Moleküle dieser Kollagene werden aus Ketten mit einem relativen Molekulargewicht < 95.000 zusammengestellt. Tabelle 4 zeigt in gleicher Weise wie die beiden vorgenannten die Charakteristiken dieser beiden Kollagentypen.

Kollagentyp	rel. Molekulargew. d. Ketten	Kettenkomposition	Form der Aggregate
IX	85.000	$\left[\begin{array}{l} \alpha 1(\text{IX}) \\ \alpha 2(\text{IX}) \\ \alpha 3(\text{IX}) \end{array} \right]$	Aggregate unbekannter Struktur in Chondrozyten
X	59.000	$\left[\alpha 1(\text{X}) \right]_3$	Aggregate unbekannter Struktur in Zonen hypertropher Chondrozyten

Tab. 4 Die Kollagentypen der Gruppe 3, ihr mittleres relatives Molekulargewicht, ihre Kettenkomposition und die Form ihrer Aggregatbildung.
aus: MILLER, E. (186)

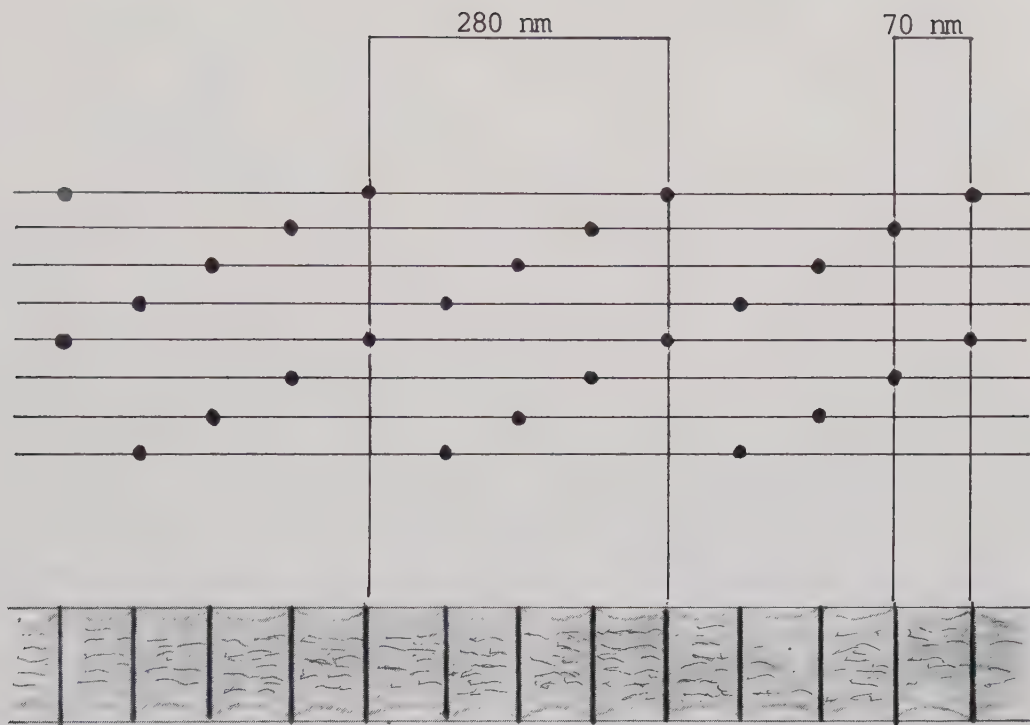
Bei der Beschreibung der Kollagentypen möchte ich mich auf die bisher am besten beschriebenen fünf Kollagentypen beschränken und auf die für diese Arbeit interessanten Typen I und III besonders eingehen.

Typ I-Kollagen $[\alpha 1(I)]_2 \alpha 2(I) ; [\alpha 1(I)]_3 :$ (187, 204, 205)

Das Typ I-Kollagen besteht aus zwei identischen $\alpha 1$ -Ketten und einer nicht identischen $\alpha 2$ -Kette. Es ist das am meisten vertretene Kollagen in Knochen, Sehnen, Zähnen, Faszien, Organkapseln und kommt mit anderen Kollagenen zusammen auch in Haut, Leber, Herz, Nieren und Lungen vor. Ein kleiner Teil liegt als Trimer $[\alpha 1(I)]_3$ vor und kann unter unterschiedlichen experimentellen Bedingungen aus Sehnen und der Schädeldecke von Hühnerembryonen isoliert werden (204, 205). Die Zellen, die diesen Kollagentyp produzieren, sind Fibroblasten, Osteoklasten und Osteoblasten (187).

In reifen Geweben zeigt sich das Typ I-Kollagen in der Form einer dicken Fiber (2 - 10 μm) im Lichtmikroskop. Mit der Picrosirius-Polarisations-Methode erscheinen diese Fibern dick, stark doppelbrechend, gelb oder rot, im Elektronenmikroskop als Bündel dicht gepackter Fibrillen mit einem durchschnittlichen Durchmesser von 75 nm.

Diese typische ultrastrukturelle Morphologie unterscheidet sich von den Kollagentypen II und III und erlaubt ihre Charakterisierung durch die Elektronenmikroskopie. Unterteilt man diese Fibrillen in longitudinale Abschnitte, beobachtet man eine charakteristische periodische, transverse Streifung, die aus 68 nm breiten Banden besteht und durch eine Verschiebung der Kollagenfibrillen zustande kommt. Sie ist für alle Kollagentypen charakteristisch und wird in Abb. 2 verdeutlicht. Typ I-Kollagen ist hauptsächlich dort zu finden, wo Spannkkräfte auftreten (187).



Kollagenfibrille

Abb. 2 Die versetzte Anordnung der Kollagenmonomeren mit ihren Köpfen. Sie ist für die 70 nm - Abstände in hydratisierten Kollagenfibrillen verantwortlich.
aus: LEHNINGER, A. (158)

Typ II-Kollagen $[\alpha 1(\text{II})]_3$:

(187, 204, 205)

Es besteht aus drei identischen α -Ketten, $\alpha 1(\text{II})$ genannt. Außer in hyalinem und elastischem Knorpel kommt es auch in Cornea, Glaskörper und Retina vor. Dieser Kollagentyp wird von Chondroblasten produziert.

Im Lichtmikroskop zeigt er keine Fibrillen, im Elektronenmikroskop erscheint er als loses Netz sehr dünner, locker gelagerter Fibrillen mit einem durchschnittlichen Durchmesser von 20 nm. Typ II-Kollagen enthält mehr Hydroxylysin- und Carbohydratanteile als Typ I-Kollagen.

Typ III-Kollagen $[\alpha 1(\text{III})]_3$:

(187, 204, 205)

Dieser Kollagentyp tritt gewöhnlich gemeinsam mit dem Kollagen Typ I zu 10 - 50% des gesamten Kollagens im reifen Gewebe auf (z.B. in Uterus, Haut, Arterien, Lungen, Milz, Leber, Nieren, Intestinum etc.). Er besteht aus drei identischen $\alpha 1$ -Ketten, $[\alpha 1(\text{III})]_3$. Jede α -Kette enthält je zwei Cysteinreste. Sie bilden neben den aldehydbedingten Vernetzungen Disulfidbrücken aus. Typ III-Kollagen besteht zu mehr als 30% aus Glycin und zu mehr als 10% aus Hydroxyprolin.

Unter dem Lichtmikroskop zeigt dieser Kollagentyp dünne (0,5 - 2 μm) argyrophile, wenig doppelbrechende, grünliche Fibern, die mit den klassischen Retikulinfasern der Histologen korrespondieren. In allen untersuchten Geweben trifft die Anwesenheit dieser Fibern ohne Ausnahme mit der Anwesenheit von Typ III-Kollagen zusammen, das durch biochemische Methoden nachgewiesen wurde. Die Argyrophilie dieser Fibern wird durch den Carbohydratanteil und nicht durch ihren Proteinanteil bewirkt.

Im Elektronenmikroskop zeigen sich die Retikulinfasern als lose zusammengelagerte Bündel von dünnen Fibrillen mit einem mittleren Durchmesser von 45 nm. Der interfibrilläre Raum

stellt reichlich dünne, unregelmäßig kurze, elektronenverteilte Brüche dar, die diese Fibrillen trennen.

Typ III-Kollagen wird in Geweben und Organen gefunden, die ein bewegliches strukturelles Gerüst benötigen, wie z.B. Arterien oder die Muskelschichten von Intestinum, Uterus etc.

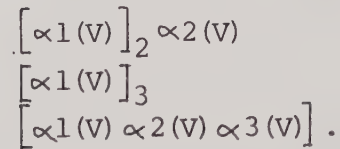
Typ IV-Kollagen $[\alpha 1(IV)]_3$: (187, 204, 205)

Drei identische $\alpha 1$ -Ketten bilden diesen Kollagentyp, der vorwiegend in Basalmembranen vorkommt. Die Ketten enthalten mehr 3-Hydroxyprolin, Hydroxylysin und Carbohydrate, dagegen weniger Alanin als das interstitielle Kollagen. Sein Anteil liegt bei 10 - 13% des gesamten Kollagens. Obwohl das meiste der Carbohydrate im Basalmembrankollagen Galaktose und Glukose ist, können auch andere Zucker in einem geringen Anteil enthalten sein. Dieser Kollagentyp - wie auch das im folgenden zu besprechende Typ V-Kollagen - zeigt in seiner chemischen Struktur sowie in anderen für diesen Typ charakteristischen Verbindungen zu Glykoproteinen und Proteoglykanen in den Basalmembranen Besonderheiten, die oft Anlaß zu Kontroversen sind. Auf sie soll in diesem Rahmen nicht eingegangen werden. Basalmembrankollagene bilden keine Fibrillen oder Fibern. Trotzdem kann eine klare Doppelbrechung in vielen Fällen nachgewiesen werden, wenn mit der Picrosirius-Polarisations-Methode untersucht wird und man annimmt, daß Basalmembrankollagenmoleküle regelmäßig angeordnet sind. Typ IV-Kollagen kann u.a. aus Haut, Placenta, Leber, Milz, Pankreas und Nieren isoliert werden. Es kommt aber auch in der Linsenkapsel und der Cornea vor.

Typ V-Kollagen :

(187, 204, 205)

Typ V-Kollagen besteht aus drei α -Ketten mit folgender Zusammensetzung :



Diese Ketten sind den α -Ketten anderer Kollagene ähnlich, enthalten aber scheinbar kugelige Bereiche, die während der extrazellulären Modifikation nicht beseitigt werden. Alle bei Typ IV-Kollagen beschriebenen Eigenschaften und Charakteristiken der Basalmembrankollagene sind für Typ V-Kollagen ebenso gültig.

Für beide Kollagentypen gelten ferner folgende Hauptfunktionen:

1. struktureller Halt für Epithelien,
2. Filterkapazität, die am besten in renalen Glomeruli untersucht ist.

Epithelzellen gelten als Sitz der Basalmembrankollagensynthese.

Aufzeichnungen der Peptide nach Cyanogenbromid-Spaltung zeigen, daß Typ V-Kollagen genetisch von anderen Kollagenen verschieden ist. Es wird angenommen, daß es als Matrix für frühe embryonale Entwicklung gelten kann (217).

2.2.3. Die Kollagenbiosynthese : (23, 25, 67, 129,
138, 145, 154, 187, 204, 205, 217)

Die Biosynthese der Kollagenfibrillen läuft in zwei Stufen ab. Die erste Stufe korrespondiert mit einer großen Zahl von Einzelschritten, die intrazellulär ablaufen und hauptsächlich in der Synthese und Zusammenlagerung von Prokollagen-Molekülen besteht. Die zweite Stufe ist extrazellulär und besteht in der Transformation von Prokollagen in Kollagen und seiner Vereinigung zu stabilen, vernetzten Strukturen.

Prokollagene enthalten kugelige Peptidausstülpungen am Amino- und Carboxylende ihrer drei Polypeptidketten, den sog. Pro- α -Ketten. Ihre genaue Struktur veranschaulichen folgende Abbildungen. (Abb. 3)

Im Falle des Typ I-Prokollagens sind zwei Polypeptide als Pro- α 1(I)-Ketten und eine Kette als Pro- α 2(I) zusammengeslossen. Für die weiteren Kollagentypen konnten auch spezifische Prokollagene nachgewiesen werden. Auf diese soll im Rahmen dieser Arbeit nicht eingegangen werden.

Die Prokollagenbiosynthese findet bis zur Sekretion des Prokollagens in einer Vielzahl von Schritten in Fibroblasten und glatten Muskelzellen statt. Eine Zelle vermag mehr als einen Kollagentyp zu synthetisieren. Untersuchungen haben gezeigt, daß Fibroblasten mehr Typ I-Kollagen und glatte Muskelzellen mehr Typ III-Kollagen bilden.

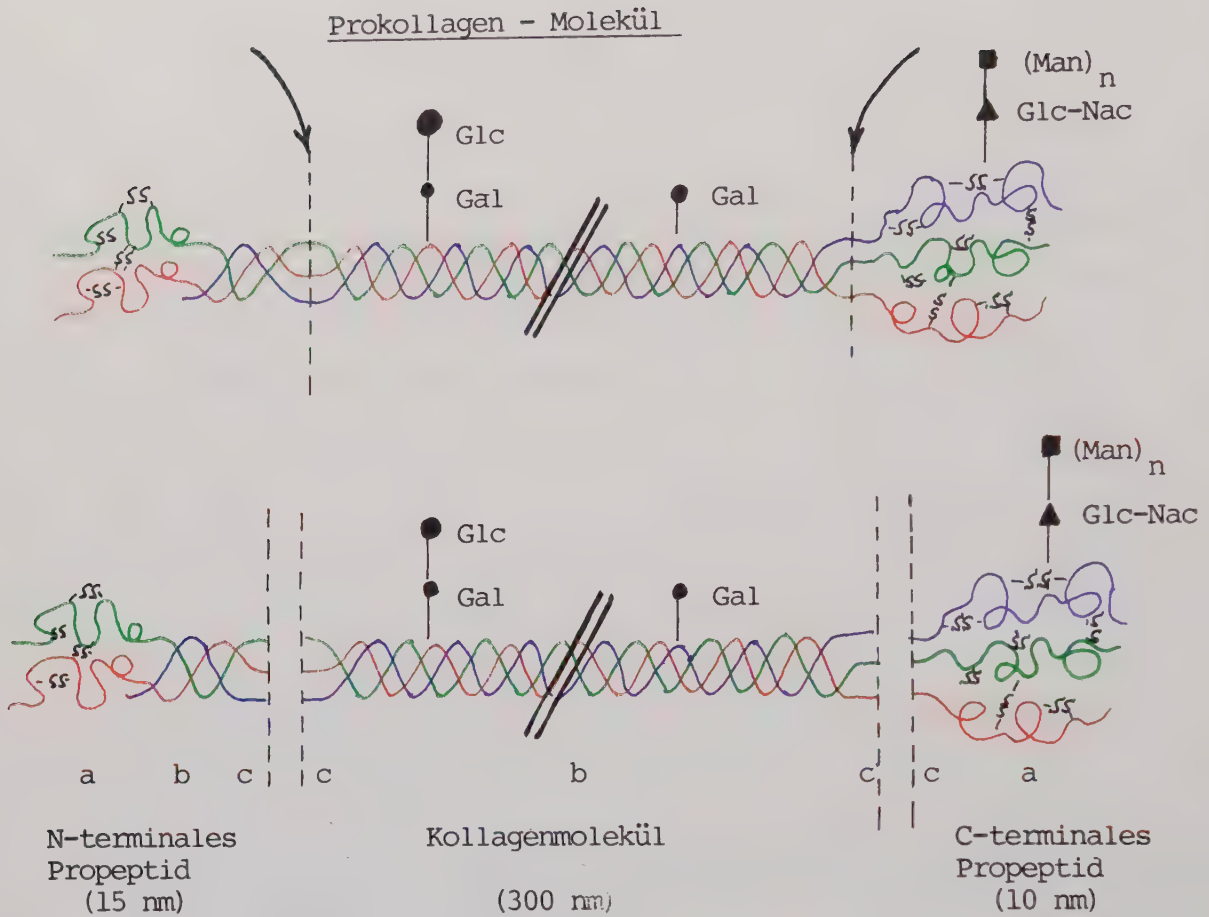


Abb. 3 Schematische Darstellung der Struktur des Prokollagen-
moleküls
aus: PROCKOP, D.J. (204)

Legende :	Glc-Nac	N - Acetylglucosamin
	Glc	Glukose
	Gal	Galaktose
	Man	Mannose
	a	globuläre Region
	b	tripelhelikale Region
	c	nicht-tripelhelikale Region

Im folgenden werden die einzelnen Syntheseschritte besprochen.

1. Synthese der Pre-Prokollagen-Polypeptide

Die Synthese beginnt im Kern der Zellen mit der Transskription von messenger-Ribonukleinsäure (mRNA). Nach PROCKOP, KIVIRIKKO et al. (204, 205) gibt es für jede Pro- α -Kette eine spezifische mRNA. Diese verbindet sich mit ribosomaler RNA an der Oberfläche des rauhen endoplasmatischen Retikulums (ER) und begünstigt die Synthese der Pre-Prokollagen-Polypeptide, die in die Zisternen des rauhen endoplasmatischen Retikulums transportiert werden. Es kommt zur Anlagerung von Pre-Pro- α -Ketten an membrangebundene Ribosomen. Diese Ketten besitzen Signalsequenzen, die für einzelne Prokollagentypen verschieden sind. Diese Signal- oder Pre-Sequenzen beaufsichtigen scheinbar die Bewegung der Polypeptide in das rauhe endoplasmatische Retikulum und sind für die Anknüpfung an die Ribosomen verantwortlich.

2. Spaltung der Signalsequenzen

In den Zisternen des rauhen endoplasmatischen Retikulums treffen die Pre-Pro- α -Ketten auf Proteasen, die die Signalsequenzen abspalten.

3. Glykosylierung durch lipidabhängige Glykosyltransferase vom C-terminalen Ende der Pro- α -Ketten mit N-glykosidisch gebundener Carbohydrat-Seitenkette verbunden mit N-Acetylglucosamin- und Mannoseresten

Dieser Schritt wird durch zwei spezifische Enzyme katalysiert :

1. die Galaktosyltransferase fügt Galaktose zu den Hydroxylysylresten hinzu und
2. die Glukosyltransferase fügt Glukose Galaktosyllysylresten hinzu.

Beide Enzyme benötigen Zucker in Form von Uridinphosphatglykosid und die Anwesenheit zwei-wertiger Kationen. Es wird zwei-wertiges Magnesium (Mg^{2+}) bevorzugt. Voraussetzung für das Gelingen dieser Operation ist, daß die Pro- α -Ketten in nicht helikaler Form vorliegen und daß sie nicht auf tripelhelikale Substrate wirken.

Die Anlagerung von Zucker beginnt kurz nachdem die N-terminalen Enden in die Zisternen des rauhen endoplasmatischen Retikulums wandern und Hydroxylysine synthetisiert sind. Dieser Prozeß kann auch nach der Trennung von den Ribosomen weiterlaufen. Er hört auf, wenn die Kollagene in eine Tripelhelix gefaltet sind.

4. Hydroxylierung von Prolyl- und Lysylresten durch spezifische an Eisen angelagerte und Vitamin C-abhängige Oxygenasen

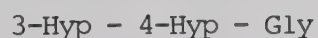
In den Zisternen des rauhen endoplasmatischen Retikulums treffen die Pro- α -Ketten auf drei hydroxylierende Enzyme, die hier lokalisiert sind. Zwei Hydroxylasen verändern Prolylreste zu 4-Hydroxyprolin oder 3-Hydroxyprolin, die dritte verwandelt Lysin in Hydroxylysin. Alle drei Reaktionen werden durch die gleichen Co-Faktoren katalysiert.

Diese sind : Eisenionen,
molekularer Sauerstoff,
 α -Ketoglutarat und
Ascorbinsäure.

Alle drei Hydroxylasen wirken spezifisch auf die Substrate ein, die folgende Forderungen erfüllen müssen :

1. hydroxylierte Reste müssen im Peptid lokalisiert sein und die richtige Position in der Aminosäuresequenz besetzen;
2. Peptide dürfen keine helikale Konformation haben;
3. Prolyl-4-Hydroxylase und Lysyl-Hydroxylase wirken nur an Prolyl- oder Lysylresten in Y-Position der Peptide mit X - Y - Gly - Sequenz. Daraus ist zu schließen, daß 4-Hydroxyprolin und Hydroxylysin nur in Y-Position des oben genannten Triplets auftreten;
4. Prolyl-3-Hydroxylase wirkt nur auf Prolylreste in X-Position ein.

Nach PROCKOP, KIVIRIKKO et al. (204, 205) hydroxyliert die Prolyl-3-Hydroxylase die X-Position nur, wenn die Y-Position schon als 4-Hydroxyprolin besetzt ist. Es folgt die Sequenz :



Die so transformierten Prokollagenpeptide werden umeinander geschlungen und formen eine Tripelhelix. Die Prolinhydroxylierung ist für die tripelhelikale Konformation und die Stabilität von entscheidender Bedeutung. (Vergleiche hierzu auch die folgenden Punkte 6 und 7 der Synthese.)

5. Addition von Galaktose oder Glukosylgalaktose an einige Hydroxylysinreste in O-glykosidischer Bindung

Viele Hydroxylgruppen der Hydroxylysylreste sind Plätze für die Anlagerung von Galaktose oder dem Disaccharid Glukosylgalaktose durch O-glykosidische Bindung. Dieser Prozeß findet - analog zu anderen sekretorischen Proteinen - wahrscheinlich im Golgi-Apparat statt. Die Addition von Zuckerresten und die Lysylhydroxylierung sind für die Hydrophilie der Kollagenmoleküle von Bedeutung.

6. Ausbildung von -S-S-Bindungen zwischen den Ketten

In ihren voll entwickelten Formen enthalten die Kollagentypen I und II keine Cysteine in ihren Polypeptidketten. Deshalb scheinen Disulfidbrücken bei diesen Kollagentypen keine Rolle bei der Vernetzung zu spielen.

Disulfidbrücken kommen nur in Carboxypropeptiden des Prokollagens vor und können erst synthetisiert werden, wenn die meisten Ketten translatiert sind. Sie spielen bei der Orientierung der Prokollagene beim Bilden der Tripelhelix primär durch Einwirkung der Prokollagenpeptidase eine entscheidende Rolle.

Die Kollagentypen III, IV und V besitzen dagegen Cysteinreste in ihren α -Ketten. Es bilden sich intramolekulare Disulfidbrücken als Ausgangspunkt einer intramolekularen Vernetzung.

7. Zusammenschluß der Pro- α -Ketten zur Bildung von Prokollagenmolekülen

Die transzelluläre Bewegung des Prokollagens erfordert die Bildung einer Tripelhelix. Wie unter Punkt 4 beschrieben, werden die Voraussetzungen für die Bildung der tripelhelikalen Konformation vor allem durch Lysyl- und Prolylhydroxylierung sowie die Addition von Zuckern erreicht.

Die so transformierten Prokollagenmoleküle wandern in die Golgi-

Vesikel, um in den Extrazellulärraum gepreßt zu werden. Es kann gezeigt werden, daß Mikrotubuli und Mikrofilamente an diesem Transportprozeß des prokollagenen Materials beteiligt sind.

Viele Substanzen oder Vorgänge, die die intrazellulären, post-translationalen Modifikationen stören, inhibieren die transzelluläre Bewegung aus den Fibroblasten. Diese Behinderung wirkt jedoch nur sekundär im Vergleich zur mangelnden Bildung tripelhelikalen Kollagens.

8. Extrazelluläre Modifikationen des Kollagens - die Umwandlung von Prokollagen in Kollagen

Die Umwandlung des Prokollagens in Kollagen beginnt mit der Spaltung der amino- und carboxy-terminalen Enden des Prokollagens durch spezifische Proteasen (Prokollagen-Peptidase) in kollagentypen-spezifischen Mengen und dem Zusammenlagern der Ketten zu fibrillären Konfigurationen. Die noch unreifen Fibrillen besitzen noch nicht die Reißfestigkeit reifen Kollagens, so daß eine Vielzahl kovalenter Bindungen geknüpft werden müssen. Diese Vernetzung erfolgt in mehreren Schritten. Zunächst kommt es zur oxidativen Desaminierung der ϵ -Aminogruppen spezifischer Lysyl- oder Hydroxyllysylreste durch das Enzym Lysyloxidase. Aus dieser Oxidation gehen reaktive Aldehyde hervor, die zwei verschiedene Arten der Vernetzung bilden können :

1. intramolekulare Vernetzungen :

Die Aldehyde zweier benachbarter α -Ketten des gleichen Kollagenmoleküls reagieren miteinander. Es entsteht ein Aldolkondensationsprodukt.

2. intermolekulare Vernetzungen :

Die Kondensation findet zwischen einem Aldehyd-abkömmling, Hydroxylysin oder einem glykosylierten Hydroxylysin und einer ϵ -Aminogruppe eines zweiten Lysins, Hydroxylysins oder eines glykosylierten Lysins eines zweiten Kollagenmoleküls statt. Auf diese Weise wird eine Schiff'sche Base ($R_1 - HC = N - R_2$) synthetisiert, die selbst jedoch instabil ist, aber als Precursor für eine Vielzahl stabiler Vernetzungen dient.

Diese stabileren Vernetzungen gehen z.B. aus einer Verschiebung der Ketten um eine Doppelbindung der Schiff'schen Base unter Bildung eines Ketons hervor.

Dies kann auch durch weitere Interaktionen erreicht werden :

- durch Hydratation und Oxidation zur Bildung neuer Peptidbrücken sowie
- durch komplexere Umordnungen, die eine Reaktion mit zusätzlichen Aminosäureseitenketten, wie der Imidazolgruppe des Histidins und/oder Glukose- und Galaktose- resten zur Folge haben.

Diese Reaktionen sind zeitabhängig und mit Alter und Reife des Kollagens verknüpft. Sie geben den Kollagenfasern ihre Reißfestigkeit.

Folgende Tabelle und Abbildung veranschaulichen die komplexen Abläufe der Kollagenbiosynthese.

Stufe	Ort	Enzyme	Signifikanz
1			
Transskription und Translation	Nukleus Polysomen d. rauhen ER	Polymerase Proteinsynthesesystem	Pre-Prokollagensynthese
2			
Formation d. Pro- α -Ketten	rauhes ER	Signalsequenzprotease	Abspalten der Signalsequenzen
3			
Glykosylierung	rauhes ER	Galaktosyl- und Glukosyltransferase	Glykosylierung vom C-terminalen Ende der Pro- α -Ketten mit N-glykosidisch gebundener Carbohydrat-Seitenkette verbunden mit N-Acetylglucosamin- und Mannoseresten
4			
Prolinhydroxylierung	rauhes ER	Prolylhydroxylase	H-Banden-Formation notwendig für Tripelhelixkonformation
Lysinhydroxylierung	rauhes ER	Lysylhydroxylase	notwendig zur Bildung intramolekularer Vernetzungen
5			
Glykosylierung	rauhes ER Golgi-Apparat		Addition von Galaktose oder Glukosylgalaktose an einige Hydroxylsylreste in O-glykosidischer Bindung, bedeutend für die Hydrophilie der Kollagenmoleküle

Stufe	Ort	Enzyme	Signifikanz
6 Prokollagenformation	rauhes ER Golgi-Apparat		Tripelhelixformation, notwendig zum Ausschleusen der Moleküle, Ausbilden von -S-S-Bindungen
7 Ausschleusen d. Prokollagens	Golgi-Apparat, Mikrotubuli, Mikrofilamente		Prokollagen jetzt extrazellulär
8 Konversion von Prokollagen in Kollagen	Plasmamembranfläche und/oder Extrazellulärraum	Prokollagenpeptidase	Spaltung der amino- und carboxy-terminalen Enden des Prokollagens in typenspezifischen Mengen
Fiberformation	Extrazellulärraum	Lysyloxidase	Fiberformation und Stabilisierung des Kollagenmoleküls durch intermolekulare Vernetzungen

Tab. 5 Übersicht über die einzelnen Stufen der Kollagenbiosynthese, den Ort der Synthese, die beteiligten Enzyme und die Synthesereaktionen
Die blauen Punkte markieren die Syntheseschritte in Übereinstimmung mit der nachfolgenden Abbildung.
aus: MONTES, G.S. et al (187)

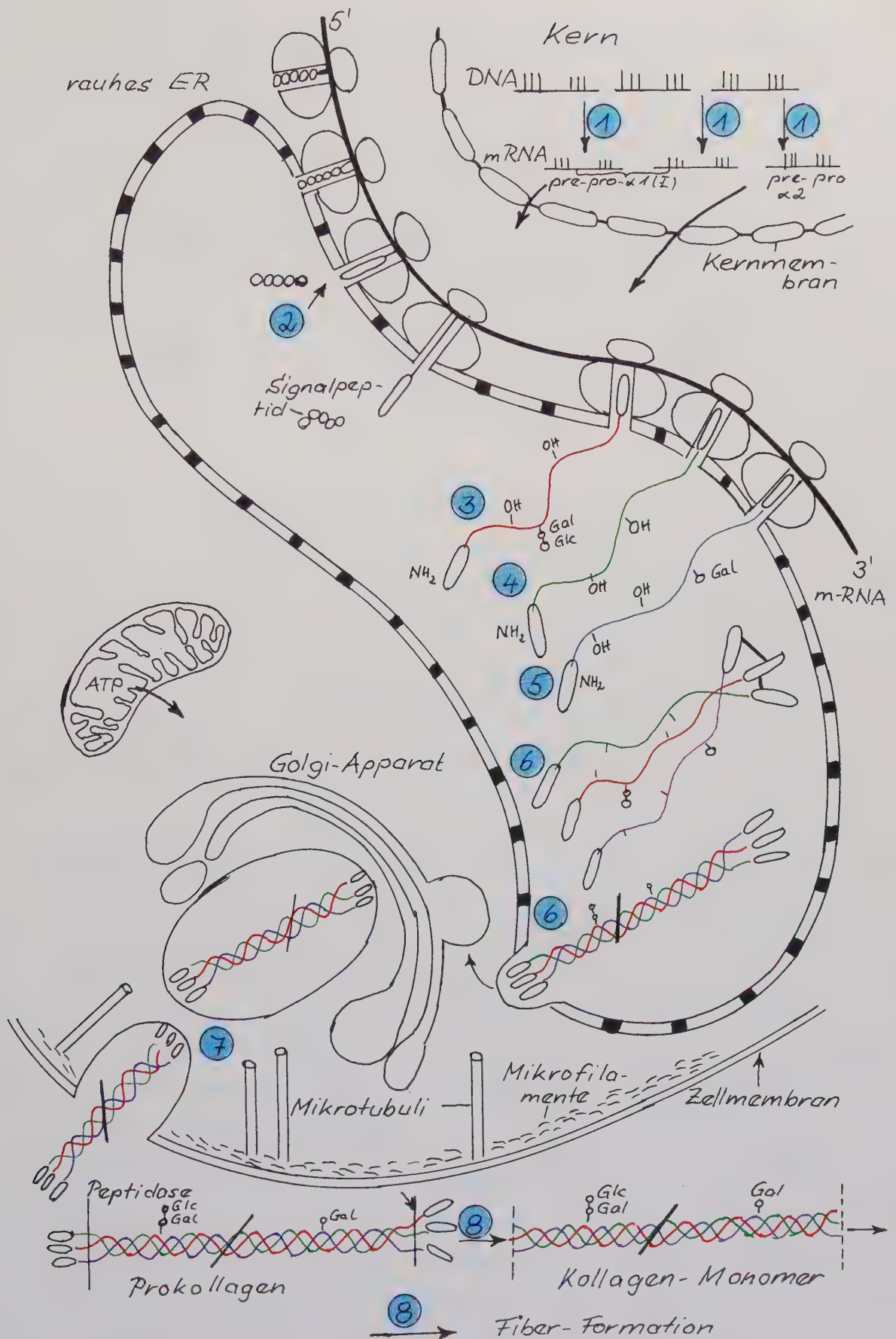


Abb. 4 Schematische Darstellung der Kollagenbiosynthese
 Autor, modif. nach KANKE, Ph. (129) u. MONTES, G. (187)

2.3. Die Entwicklung der menschlichen Lunge
(15, 64, 147, 188, 192, 212)

Die fetale Lungenentwicklung läßt sich in folgende Abschnitte unterteilen :

2.3.1. Die pränatale Lungenentwicklung

- 2.3.1.1. Die embryonale Periode
- 2.3.1.2. Die pseudoglanduläre Periode
- 2.3.1.3. Die kanalikuläre Periode
- 2.3.1.4. Die terminale Periode

2.3.2. Die postnatale Lungenentwicklung

- 2.3.2.1. Die alveoläre Periode

2.3.1. Die pränatale Lungenentwicklung

2.3.1.1. Die embryonale Periode (4. - 7. SSW)

Die Lungenentwicklung beginnt zwischen dem 22. und 26. Tag post conceptionem als Ausstülpung des primitiven Hypopharynx (Abb. 5 A). Am Ende des ersten und zu Beginn des zweiten Entwicklungsmonats entstehen zwei knospenartige Ausstülpungen, die Lungenknospen (Abb. 5 B). Sie sind die primitiven Anlagen der Bronchien und asymmetrisch angelegt. Der rechte Stammbronchus wächst dorsoventral, der linke fast quer (Abb 5 C). Dem rechten Stammbronchus entspringen zwei, dem linken dagegen nur eine Knospe (Abb 5 D). In weiteren Schritten folgt eine lappenförmige Anordnung der Bronchien (Abb. 5 D und E), die bei einer Scheitel-Steiß-Länge von 7 mm abgeschlossen ist. Durch weitere Aufzweigungen der jeweils erweiterten Endknospen entstehen in der 6. Schwangerschaftswoche Segmentbronchien (Abb 5 F) sowie in der 8. Schwangerschaftswoche (SSW) Subsegmentbronchien.

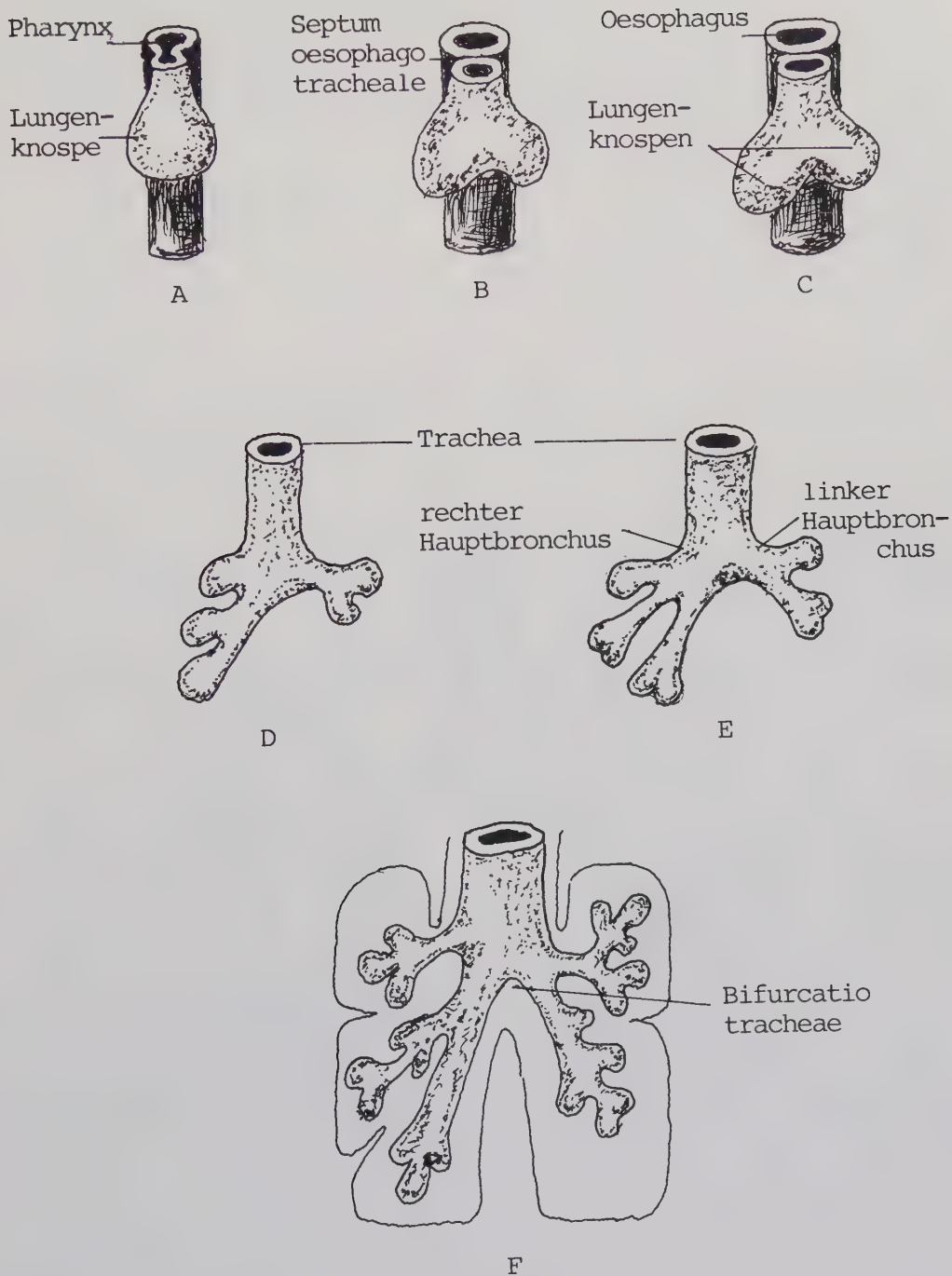


Abb 5 A - F Schematische Darstellung der Lungenentwicklung in der embryonalen Entwicklungsperiode
 Autor, modifiziert nach MOORE, K.L. et al (188)

2.3.1.2. Die pseudoglanduläre Periode (8. - 17. SSW)

Die pseudoglanduläre Periode ist die Phase der bronchialen Entwicklung. Durch dichotome Teilungen entstehen weitere bronchiale Verzweigungen des präaziniären Bereiches. Sie treten in der rechten Lunge schneller auf als in der linken. Das histologische Bild ähnelt dem einer Drüse, weshalb diese Periode auch pseudoglanduläre Periode genannt wird.

Abb. 6 zeigt die schematische Darstellung einer Lunge in der 8. Schwangerschaftswoche.

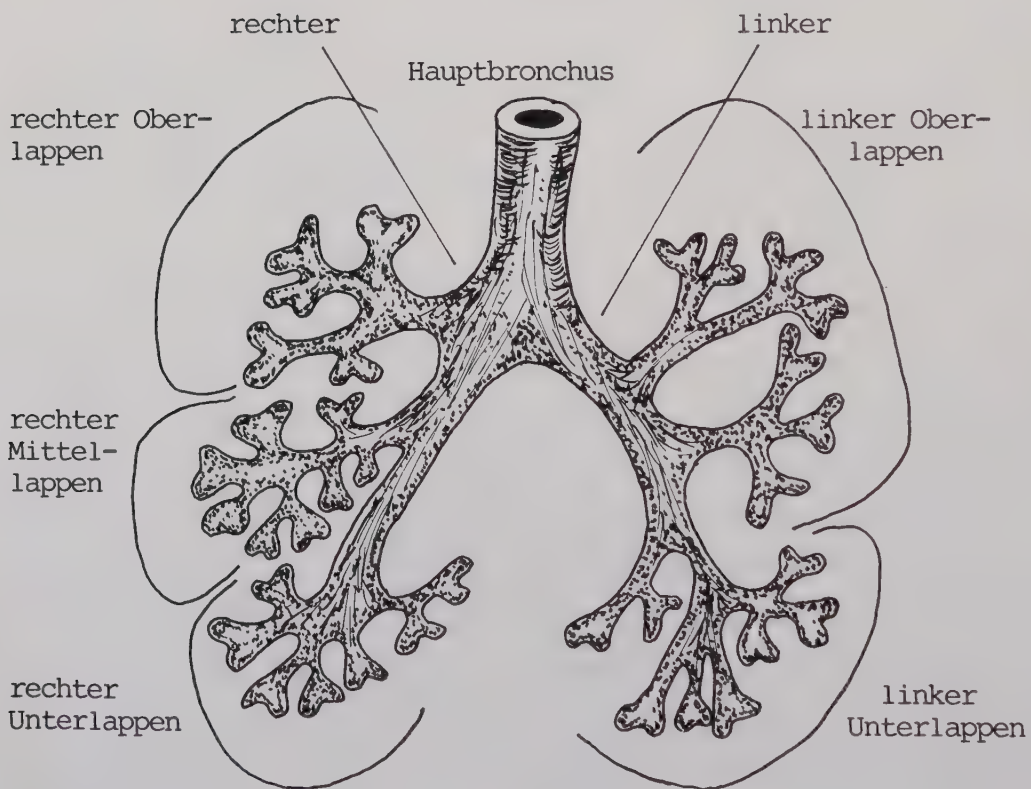


Abb. 6 Schematische Darstellung der Entwicklung des Bronchialbaumes und der Lungen zu Beginn der pseudoglandulären Periode (8. SSW)
Autor, modifiziert nach MOORE, K.I. et al (188)

Zwischen der 14. und 17. Schwangerschaftswoche findet man nach MOORE, K.L. et al (188) und nach DÖRR, W. et al (64) die maximale Zahl der Verzweigungsgenerationen für jedes Segment.

Sie liegen für :

den Oberlappen	bei 12 - 17,	
den Mittellappen	bei 18 - 23	und
den Unterlappen	bei 14 - 23 Generationen.	

Damit entspricht ihre Anzahl denen, der bei Geburt und in der reifen Lunge Erwachsener vorkommenden. Für die einzelnen Segmente kommen also keine weiteren Verzweigungsgenerationen mehr hinzu.

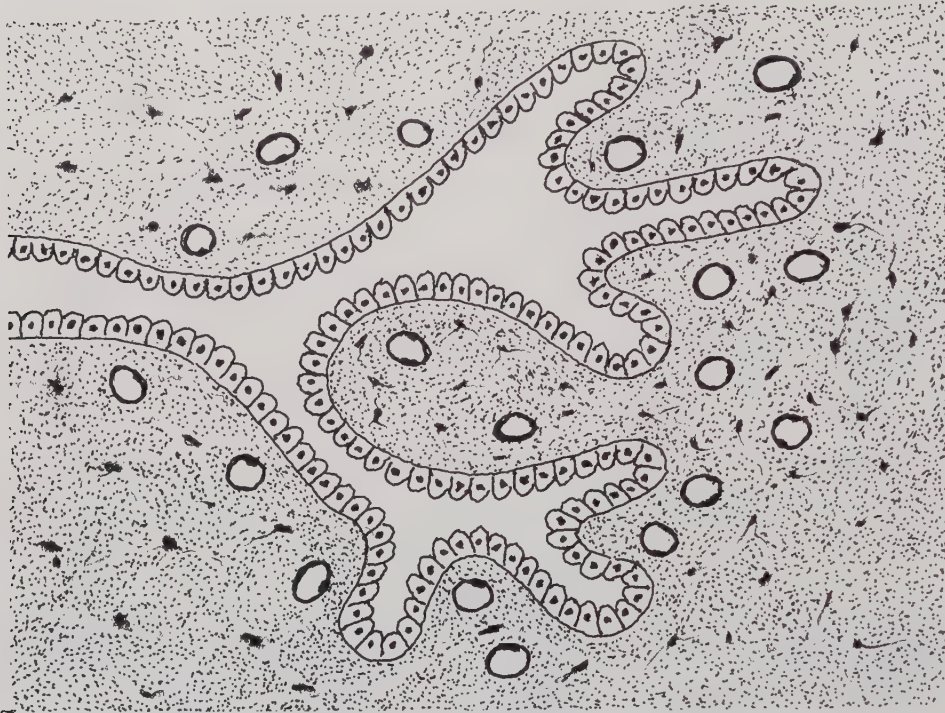
Die Wachstumsphase der broncho-pulmonalen Segmente wird durch gleichzeitige Vaskularisierung und Kapillarisierung verstärkt. Während dieser Periode zeigt die Lunge neben ihrer glandulären Struktur mit einem schmalen Epithelsaum in den Tubuli und dem vaskulären Mesenchym mit der 13. Schwangerschaftswoche Zilien. Alle wesentlichen Teile der Lunge sind somit bis auf die dem Gasaustausch dienenden Azini am Ende dieser Periode vorhanden.

2.3.1.3. Die kanalikuläre Periode (18. - 25. SSW)

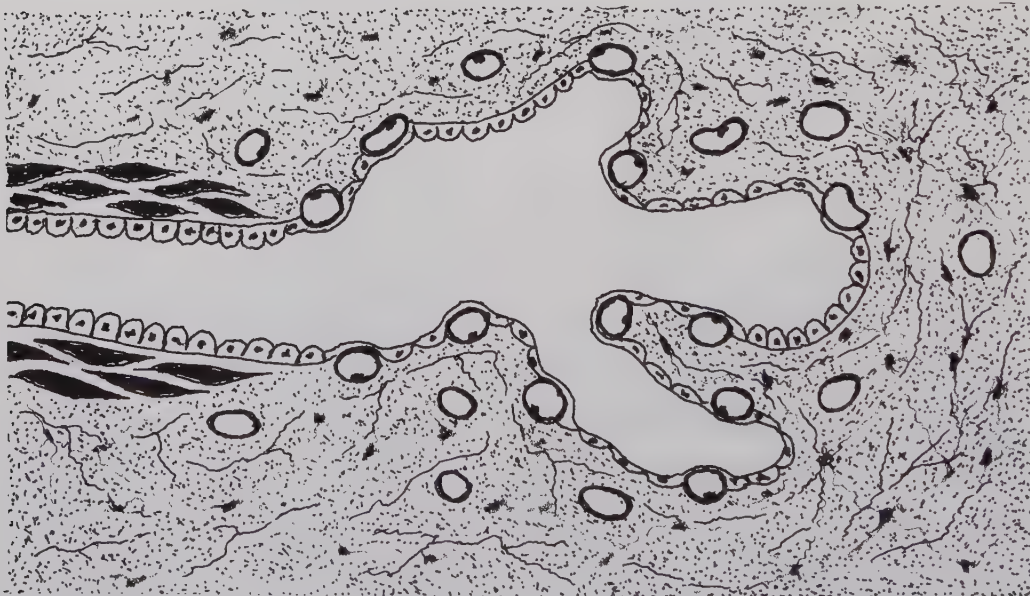
Diese Periode ist charakterisiert durch die stärker zunehmende Vaskularisierung und Kanalisierung des Mesenchyms. Es wird eine azinäre Struktur erkennbar, da das Bindegewebe zwischen den Azini immer dünner wird und relativ dicke Septa acinosa gebildet werden. Darüber hinaus werden Bronchioli terminales angelegt, aus denen durch weitere Teilungsgenerationen primitive Bronchioli alveolares entstehen. Das Wachstum dieser Abschnitte erfolgt zentrifugal, so daß mit einiger Verzögerung die Kapillarisierung und Kanalisierung der peripheren Bronchioli erfolgt. Mit der Vaskularisierung der Bronchioli alveolares ist diese Entwicklungsphase abgeschlossen. Es ist ein geringer respiratorischer Gasaustausch möglich, da einige wenige dünnwandige Sacculi alveolares bereits primitive Alveolen ausgebildet haben,

die von Kapillarkörben umschlossen werden.

Abb. 7 zeigt die schematische Darstellung der terminalen Luftwege zu Beginn und am Ende dieser Entwicklungsperiode.



Terminale Luftwege in der 20. Schwangerschaftswoche



Terminale Luftwege in der 24. Schwangerschaftswoche

Abb. 7 Schematische Darstellung der terminalen Luftwege in
der kanalikulären Periode
Autor, modifiziert nach NETTER, F.H. et al (192)

Die Pneumozyten Typ I breiten ihr Zytoplasma flächenhaft aus. Gleichzeitig kommt es zur Annäherung zwischen Lungenkapillaren und der Basalmembran des Epithels. Durch Streckung der Pneumozyten Typ I gegen die immer mehr im Alveolardeckepithel vordringenden Kapillaren wird die Blut-Luft-Schranke ausgebildet. Pneumozyten Typ II zeigen zahlreiche Zytopodien. Intrazellulär können multivesikuläre Körper beobachtet werden. In einem weiteren Differenzierungsschritt kommt es zur Bildung von homogenen, elektronendichten, osmiophilen Körpern und siegelringartigen Strukturen sowie schließlich zu den typischen lamellären Einschlusskörpern. Weisen diese Pneumozyten eine vollständige periodische Lamellierung und reife Einschlusskörper auf, kann in der Lichtung der Sacculi tubuläres Myelin nachgewiesen werden. Zu diesem Zeitpunkt ist die biochemische und zelluläre Reifung der Lunge erreicht.

2.3.1.4. Die terminale Periode (26. SSW bis zur Geburt)

In dieser Zeit werden die Bindegewebssepten zwischen den Sacculi alveolares zunehmend dünner. Die Oberfläche der potentiellen Lufträume vergrößert sich und es finden vermehrt die schon in der kanalikulären Periode begonnenen und dort besprochenen Vorgänge der Annäherung der Kapillaren an das Oberflächenepithel, der Abflachung des isoprismatischen Epithels und der Differenzierung in Pneumozyten Typ I und Typ II statt.

Die rasche Proliferation der Kapillaren in die peripheren Lungenabschnitte ermöglicht zunehmend den Gasaustausch in der Lunge, so daß ein frühgeborenes Kind von etwa 1000g Geburtsgewicht über genügend Alveolaroberfläche und vor allem über eine ausreichende Kapillarisation verfügt, um überleben zu können.



Abb. 8 Schematische Darstellung der Lungenentwicklung zu
Beginn der terminalen Periode (ca. 26. SSW)
Autor, modifiziert nach MOORE, K.L. et al (188)

2.3.2. Die postnatale Lungenentwicklung

2.3.2.1. Die alveoläre Periode (späte Fetalzeit bis 8. Lj.)

Zu Beginn dieser Periode enden die Bronchioli terminales in dünnwandigen Alveolarsäckchen, die durch lockeres embryonales Bindegewebe voneinander getrennt sind. Es sind Ducti alveolares, die in den ersten Lebensmonaten aus den Sacculi neben den reifen Alveolen gebildet werden (Abb. 9)



Abb. 9 Schematische Darstellung der Lungenentwicklung bei einem Neugeborenen in der frühen Alveolarperiode.
Autor, modifiziert nach MOORE, K.L. et al (188)

Die Distanz von einem peripheren Bronchiolus terminales bis zu den dazugehörigen Alveolen unter der Pleura gilt als Maß für die Größenzunahme der Acini.

Sie beträgt nach DÖRR, W. et al (64) :

bei der Geburt	etwa 1,1 mm ,
im 2. Lebensmonat	etwa 1,75 mm ,
im 7. Lebensjahr	etwa 4,0 mm.

Auch die Gasaustauschfläche vergrößert sich in der alveolären Periode erheblich.

Sie beträgt :

bei der Geburt	2.80 m ² ,
im 3. Lebensmonat	6,47 m ² ,
im 8. Lebensjahr	32,0 m ² (64) .

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die endgültige Ausreifung der Lunge abhängig ist

von der Zunahme der Alveolarzellen und

von der Volumenzunahme der Alveolen entsprechend des Thoraxwachstums.

Die folgende Graphik (Abb. 10) zeigt den Ablauf der Lungenentwicklungsperioden in Abhängigkeit ihres Alters im Überblick.

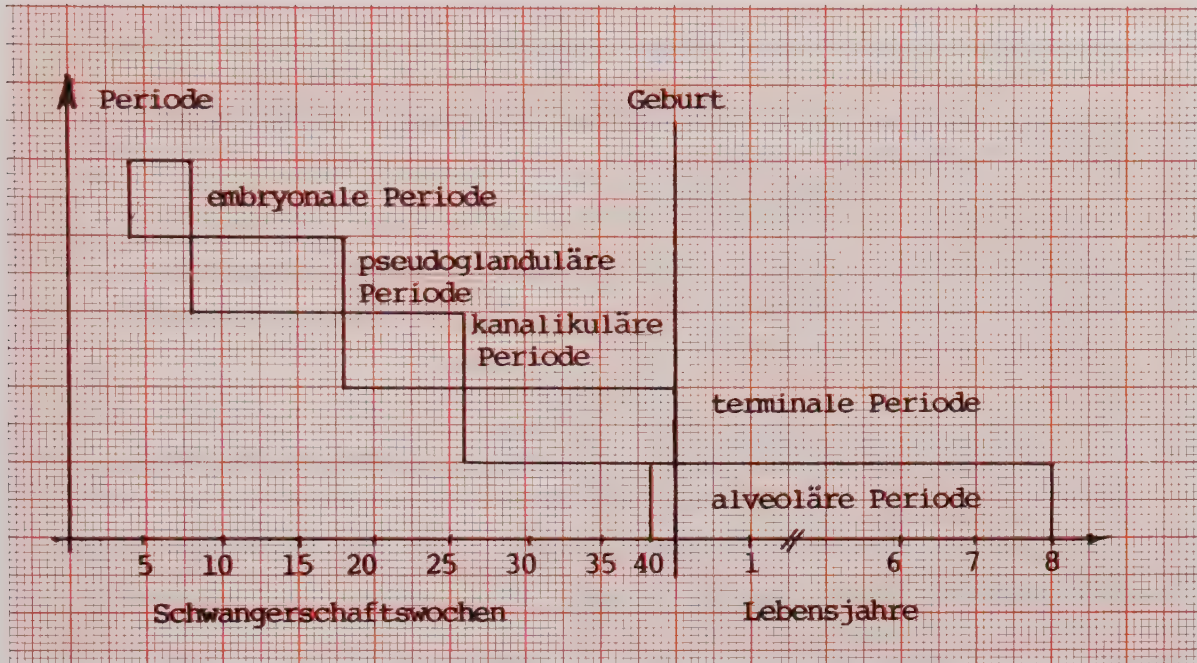


Abb 10 Graphische Darstellung der Lungenentwicklungsperioden in Abhängigkeit des Gestations- bzw. Lebensalters
Autorin, modifiziert nach BURRI, P.H. (37)

3. Untersuchungsobjekte und Untersuchungsmethode

3.1. Die Bestimmung des wahrscheinlichen Gestations- alters der Feten (63, 137, 167, 188)

KITTERMAN (137) weist darauf hin, daß sich das Lungenwachstum proportional zum fetalen Körperwachstum verhält. Daraus folgt, daß bei retardierten Feten auch mit einer Verzögerung der Lungenentwicklung gerechnet werden kann. 1981 hat KITTERMAN (137) gezeigt, daß das Lungengewicht in Prozent des Körpergewichtes eine Konstante ergibt und daß dies sowohl für Feucht- als auch für Trockengewichte gültig ist.

Bei dem vorliegenden Untersuchungsmaterial werden die Angaben aus dem Mutterpaß hinsichtlich des wahrscheinlichen Gestationsalters überprüft. Alle Angaben werden unter Berücksichtigung folgender Parameter neu eingeteilt.

Aus den Sektionsprotokollen können

Scheitel-Steiß-Länge	(SSL in mm)
Scheitel-Fersen-Länge	(SFL in mm)

entnommen werden.

Aus der Literatur gehen folgende Parameter für die Ermittlung des wahrscheinlichen Gestationsalters in die Untersuchungen mit ein :

Fußlänge	(FL in mm)
Fetalgewicht	(in g)
Ultraschallmessungen	(biparietaler Kopfdurchmesser (BIP) etc.)
äußere Merkmale.	

Die folgende Tabelle nach MOORE, K.L. et al (188) faßt die genannten Kriterien zusammen.

SSW	SSL in mm	FL in mm	Fetalgew. in g	äußere Merkmale
9	50	7	8	Augen schließen sich oder sind geschlossen, Kopf runder, äußeres Genitale noch nicht als männlich oder weiblich zu unterscheiden, Dünndarmschlingen im Nabel- strang
10	61	9	14	Dünndarm im Abdomen, Beginn der Fingernagelent- wicklung
12	87	14	45	Geschlecht äußerlich be- stimmbar, Hals zu erkennen
14	120	20	110	Kopf aufgerichtet, untere Extremitäten gut entwickelt
16	140	27	200	Ohren stehen vom Kopf ab
18	160	33	320	Vernix caseosa ausgebildet, Beginn der Zehennagelent- wicklung
20	190	39	460	Lanugobehaarung zu erkennen
22	210	45	630	Haut runzelig und rot
24	230	50	820	Fingernägel ausgebildet, magerer Körper
26	250	55	1000	Augen teilweise geöffnet, Augenlider ausgebildet

SSW	SSL in mm	FL in mm	Fetalgew. in g	äußere Merkmale
28	270	59	1300	Augen geöffnet, stärkere Behaarung, Haut leicht schrumpelig
30	280	63	1700	Zehennägel ausgebildet, Körper wird fülliger
32	300	68	2100	Fingernägel reichen zu den Fingerkuppen, Haut rosig und glatt
36	340	79	2900	Körper meist rundlich, Lanugohaare fehlen weit- gehend, Zehennägel reichen bis zu den Kuppen
38	360	83	3400	ausgeprägter Brustkorb, Fingernägel reichen über die Kuppen hinaus, Hoden im Skrotum oder im Leistenkanal tastbar

Tab. 6 Kriterien zur Bestimmung des Gestationsalters in
der Fetalzeit.
aus: MOORE, K.L. et al (188)

Diese Angaben sind jedoch für die richtige Einordnung des Untersuchungsmaterials nicht ausreichend. Parameter wie z.B. die Fußlänge werden in der Regel im Sektionsprotokoll nicht erfaßt, äußere Merkmale erscheinen nur bei Mißbildungen. So stehen als reproduzierbare Daten nur Scheitel-Steiß-Länge, Scheitel-Fersen-Länge und bei Feten über 1000g das Körpergewicht zur Verfügung.

Für die Zeit von der 12. Schwangerschaftswoche bis zur Geburt liegen Angaben über die Körpergröße vor, von der 25. Schwangerschaftswoche bis zur Geburt können Aussagen über das Körperge-

wicht der Feten in Abhängigkeit ihres biparietalen Kopfdurchmessers (BIP) und des Thoraxquerdurchmessers Ultraschalltabellen entnommen werden.

Unter Berücksichtigung dieser Parameter und des Körpergewichtes läßt sich folgende Tabelle aufstellen.

Schwangerschaftsdauer in Wochen	Scheitel-Fersen-Länge in mm	Körpergewicht in g
25	310	800
27	340	1000
29	370	1250
31	400	1600
33	430	2000
35	450	2600
37	470	3000
39	500	3500
41	510	3500
Abweichungen	± 20 mm	± 200 g

Tab. 7 Die Scheitel-Fersen-Länge älterer Feten und ihr Körpergewicht in Abhängigkeit von der Schwangerschaftsdauer.
aus: Ultraschalltabellen nach amerikanischen Quellen

Nach LUBCHENKO et al. (167) lassen sich bei Jungen und Mädchen statistisch keine signifikanten Unterschiede der Scheitel-Fersen-Länge von der 26. bis zur 42. Schwangerschaftswoche nachweisen.

Für den genannten Zeitraum gibt DIEM (63) folgende Häufigkeitsverteilung an :

SSW	P ₁₀	P ₂₅	P ₅₀	P ₇₅	P ₉₀
26	308	329	355	375	399
27	318	341	366	386	410
28	330	355	378	398	422
29	344	368	390	409	431
30	361	383	403	422	445
31	375	397	416	435	459
32	388	407	432	450	472
33	399	423	447	462	484
34	410	434	458	473	494
35	420	446	467	481	502
36	431	456	474	488	509
37	441	465	480	493	513
38	449	471	484	498	517
39	455	476	488	501	520
40	458	479	492	505	523
41	460	481	495	508	526
42	462	482	497	510	528

Tab. 8 Die Perzentilen P₁₀ bis P₉₀ geben die Häufigkeitsverteilung der Scheitel-Fersen-Längen in mm in Abhängigkeit der Schwangerschaftswochen an.
aus DIEM, K. et al. (63)

Diese Tabelle läßt sich auf linearem Wahrscheinlichkeitspapier graphisch darstellen (Abb. 11)

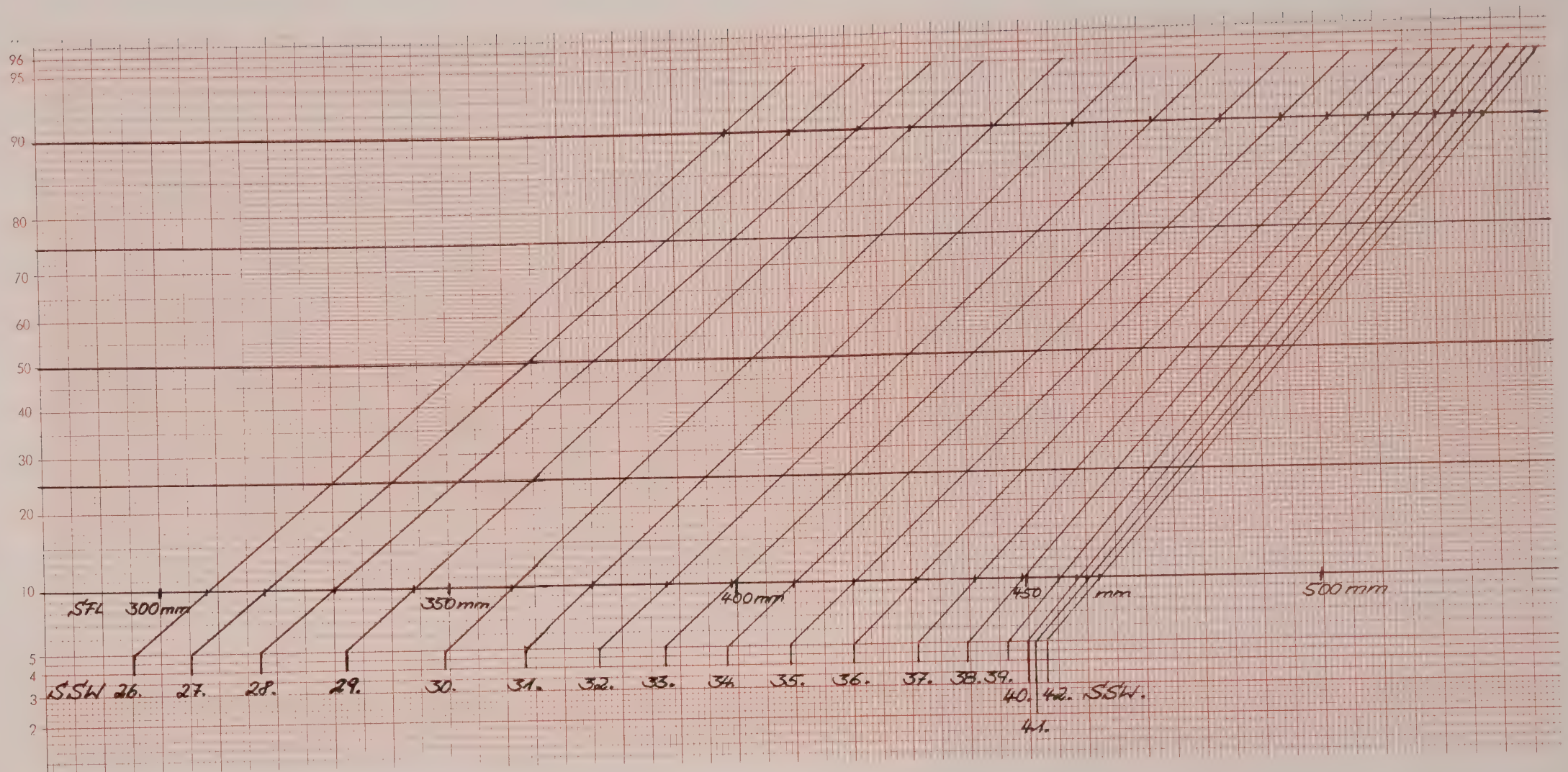


Abb. 11 Darstellung der Häufigkeitsverteilung der Scheitel-Fersen-Längen in mm in Abhängigkeit der Schwangerschaftswochen gemäß der Perzentilen P_{10} bis P_{90} der Tab. 8 nach DIEM, K. et al. (63) auf linearem Wahrscheinlichkeitspapier
Autor

Unter Berücksichtigung der angeführten Quellen sowie einiger in der Literatur verstreuten Angaben habe ich folgende Tabelle (Tab. 9) entwickelt, die es ermöglicht, die Retardierung einiger Feten anhand ihrer Scheitel-Fersen-Länge (SFL in mm) besser zu beurteilen. Man gewinnt damit die Möglichkeit, die Gewebeproben dem wahrscheinlichen Gestationsalter zuzuordnen.

SSW	SSL in mm	SFL in mm	Gewicht in g
1	0,1*	-	-
2	0,2*	-	-
3	2	-	-
4	5	-	-
5	8	-	-
6	12	-	-
7	17	19	-
8	23	30	1,0
9	28	36	6
10	35	44	11
11	44	53	15
12	56	73	19
13	70	94	37
14	84	115	51
15	98	136	78
16	112	157	105
17	124	178	157
18	136	198	208
19	148	218	259
20	160	239	310

SSW	SSL in mm	SFL in mm	Gewicht in g
21	171	254	394
22	182	268	477
23	192	282	558
24	203	296	640
25	213	310	750
26	222	325	860
27	231	340	970
28	242	355	1080
29	251	368	1228
30	260	382	1375
31	268	395	1522
32	277	409	1670
33	287	422	1853
34	296	434	2036
35	305	446	2217
36	313	458	2400
37	322	469	2695
38	331	480	2850
39	341	490	3075
40	350	500	3300
41	357	510	3500

Tab. 9 Tabellarische Übersicht über das fetale Wachstum in
Abhängigkeit vom Gestationsalter
(* Frucht total einschließlich der Hüllen)
Autor

3.2. Die Untersuchungsobjekte

In Zusammenarbeit mit der Frankfurter Universitätsfrauenklinik und ihrem histologischen Labor, dem Pathologischen Institut und dem biochemischen Labor des Instituts für Humangenetik der J.W. Goethe-Universität Frankfurt/Main kann eine kontinuierliche Reihe menschlicher Feten von der 14. Schwangerschaftswoche bis zur Geburt sowie von Neugeborenen zusammengestellt werden. Es liegen 45 Proben vor, die sich wie folgt auf die Perioden der Lungenentwicklung verteilen :

pseudoglanduläre Periode (8.-17. SSW)	5 Proben
kanalikuläre Periode (18.-25. SSW)	18 Proben
terminale Periode (26. SSW.-Geb.)	18 Proben
alveoläre Periode (späte Fetalzeit bis 8. Lj.)	4 Proben

Die folgende Graphik veranschaulicht die Verteilung der Proben unter Berücksichtigung der Schwangerschaftswochen bzw. des Lebensalters und der Lungenentwicklungsperioden (Abb. 12)

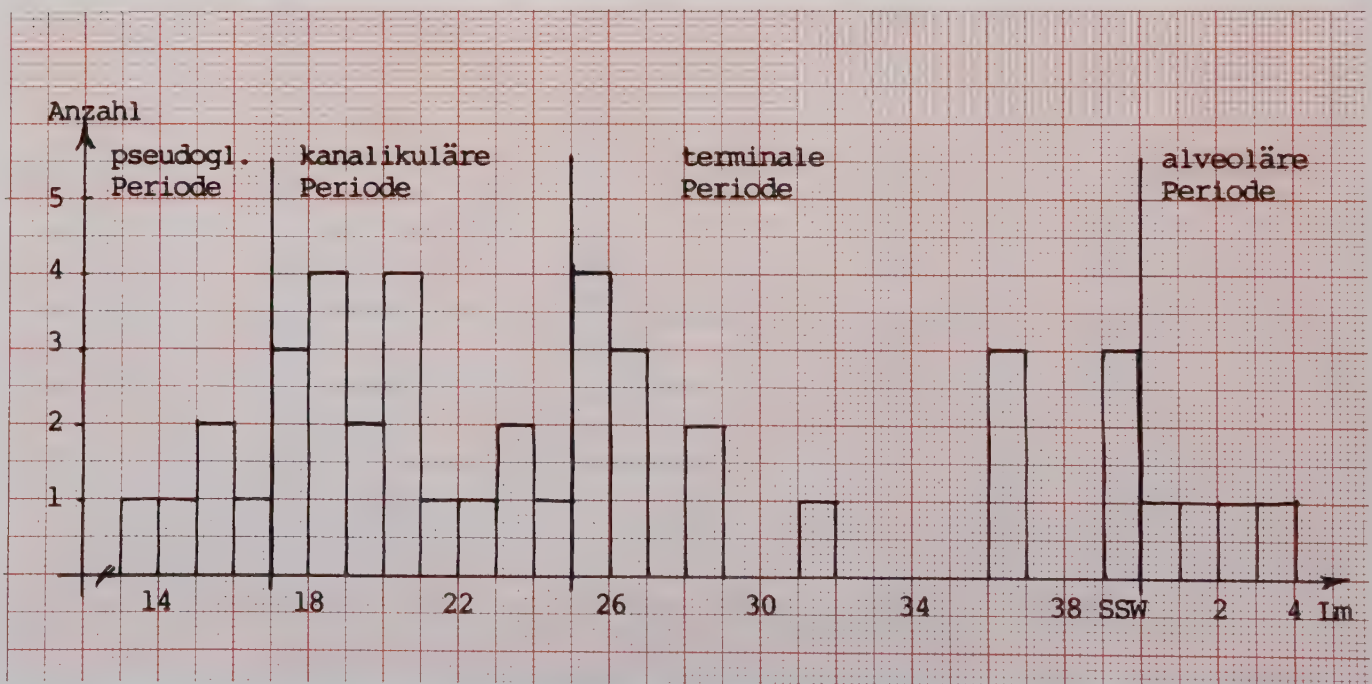


Abb. 12 Die Verteilung der Proben auf die Perioden der fetalen Lungenentwicklung.
Autor

Bei dem Untersuchungsmaterial handelt es sich einerseits um Schwangerschaftsabbrüche aus medizinischer, eugenischer, psychischer oder psychosozialer Indikation, um Spontanaborte, Früh- oder Totgeburten und andererseits um in den ersten Lebensmonaten verstorbene Kinder. Einige Fälle zeigen erhebliche Mißbildungen wie Anencephali, Vitium cordis unterschiedlicher Genese, Transposition der großen Gefäße, Chromosomenabberationen (z.B. Trisomie 18 und 21). Genauere Angaben sind der folgenden Zusammenstellung der Proben in Abhängigkeit der Lungenentwicklungsperioden zu entnehmen. Die Einteilung der Untersuchungsobjekte ergibt sich aus der Berücksichtigung des wahrscheinlichen, definierten Gestationsalters in Abhängigkeit der Scheitel-Fersen-Länge gemäß Tabelle 9.

3.2.1. Die Untersuchungsobjekte der pseudoglandulären
Periode (8. - 17. SSW)

Proben-Nr.	SSW.	SFL in mm	Fallbeschreibung
1	14	115	♂, kein Anhalt für Mißbildungen
2	15	136	♂, vorzeitige Wehen mit Frucht- abgang
3	16	140	♂, Zytomegalieinfektion Titer 1 : 40
4	16	140	♂, Fetus mortuus nach Amnio- zentese
5	17	172	♂, septischer Abort

Tab. 10 Tabellarische Übersicht über die Untersuchungsobjekte der pseudoglandulären Lungenentwicklungsperiode in Abhängigkeit ihrer Scheitel-Fersen-Länge in mm.

3.2.2. Die Untersuchungsobjekte der kanalikulären Periode
(18. - 25. SSW)

Proben-Nr.	SSW.	SFL in mm	Fallbeschreibung
6	18	186	♂, Strahlenbelastung in der Frühschwangerschaft
7	18	194	♀, Prostaglandinabort
8	18	198	♂, kein Anhalt für Mißbildungen
9	19	200	♂, intrauteriner Fruchttod, multiple Mißbildungen
10	19	210	♂, kein Anhalt für Mißbildungen
11	19	220	♂, kein Anhalt für Mißbildungen
12	20	240	♂, Heroinabusus der Mutter
13	20	240	♂, Prostaglandinabort
14	20	240	♂, kein Anhalt für Mißbildungen
15	21	250	♂, Rh - Inkompatibilität, Abort
16	21	260	♂, Prostaglandinabort
17	21	260	♀, Amnioninfektionssyndrom
18	21	260	♂, Fetus mortuus, Plazenta im Zustand der Mumifikation
19	22	270	♀, Fetus mortuus
20	22	270	♀, kein Anhalt für Mißbildungen
21	24	300	♂, Cervixinsuffizienz
22	25	310	♀, Prostaglandinabort
23	25	310	♂, Amnioninfektionssyndrom

Tab. 11 Tabellarische Übersicht über die Untersuchungsobjekte der kanalikulären Lungenentwicklungsperiode in Abhängigkeit ihrer Scheitel-Fersen-Länge in mm.

3.2.3. Die Untersuchungsobjekte der terminalen Periode
(26. SSW bis zur Geburt)

Proben-Nr.	SSW.	SFL in mm	Fallbeschreibung
24	26*	218	♀ , Anencephalus (lebte) , Zwilling von Nr. 27, Syntocinonabort
25	26*	310	♀ , Anencephalus
26	26	320	♂ , Blutung bei Placenta praevia vorzeitiger Blasensprung
27	26	320	♀ , intrauteriner Fruchttod, Zwilling von Nr. 24, kein Anhalt für Mißbildungen
28	27	430	♂ , Frühgeburt, postnatale Asphyxie, schwere Lungenverände- rungen nachweisbar (vgl. Proto- koll Probe 12 ^{ff} Pg. 89), lebte 4 Monate
29	27	330	♂ , intrauteriner Fruchttod bei schwerer EPH-Gestose und Pla- zentainsuffizienz
30	27	340	♀ , vorzeitiger Blasensprung, Amnioninfektionssyndrom
31	28	350	♂ , postnatale Asphyxie, Hirn- blutung III. Grades, Herz-Kreis- laufversagen
32	29	370	♀ , Hydrocephalus, Klumpfüße beiderseits
33	29	370	♂ , Abort bei Placenta praevia
34	29	375	♀ , Hydrops fetalis, protrahier- ter Schock, Kreislaufversagen
35	32	410	♂ , V.a. Arthrogryptosis multi- plex, V.a. Vitium cordis
36	37	470	♂ , Hydramnion, Gastroschisis, Evisceration
37	37	470	♀ , Fetus mortuus, Mazeration III. Grades

Proben-Nr.	SSW.	SFL in mm	Fallbeschreibung
38	37	470	♂, schwere postpartale Asphyxie V.a. Trisomie 18
39	40	500	♂, Transposition der großen Ge- fäße, Ateminsuffizienz, E. coli - Meningitis
40	40	530	♂, intrauteriner Fruchttod, Trisomie 18, multiple Mißbil- dungen, Hydramnion
41	Termin	530	♀, Ductusverschluß, Herzversagen

Tab. 12 Tabellarische Übersicht über die Untersuchungsob-
jekte der terminalen Lungenentwicklungsperiode
in Abhängigkeit ihrer Scheitel-Fersen-Länge in mm.
(* ungenaue SFL wegen Fehlen des Hirnschädels.)

3.2.4. Die Untersuchungsobjekte der alveolären Periode
(späte Fetalzeit - 8. Lebensjahr)

Proben-Nr.	Alter	SFL in mm	Fallbeschreibung
42	Termin	540	♂, intrauteriner Fruchttod, Mazeration III. Grades
43	2. Im	560	♀, V.a. Mors subitanea
44	3 Im + 3 Wo.	580	♂, Schädelfraktur, Hirnödem, Aortenisthmusstenose, Rechts- herzdilatation
45	4. Im	600	♂, Kardiomegalie bei Trisomie 21 akutes Herz-Kreislaufversagen

Tab. 13 Tabellarische Übersicht über die Untersuchungsob-
jekte der alveolären Lungenentwicklungsperiode
in Abhängigkeit ihrer Scheitel-Fersen-Länge in mm.

3.3. Die Verwendung des Untersuchungsmaterials

Da das Kollagen nur ca. 20 % des Trockengewichtes der Lunge beträgt und seine extreme Unlöslichkeit die Verwendung aggressiver Extraktionsmethoden bzw. die Verdauung durch Proteasen erforderlich macht, ist es nötig, eine relativ große Gewebemenge für die Isolierung der Kollagentypen einzusetzen. Hierzu werden die Proben entsprechend ihrer definierten Schwangerschaftswoche, ihres Hydroxyprolingehaltes und unter Berücksichtigung der Ergebnisse in den Sektionsprotokollen gepoolt. Proben, die durch Poolen nicht die erforderliche Mindestmenge von 1000 mg erreichen, werden zur Gesamtdarstellung von Typ I- und Typ III-Kollagen ohne die Möglichkeit der getrennten Typendarstellung verwendet.

Alle 45 Proben werden zunächst der Bestimmung ihres Kollagengehaltes durch Hydroxyprolinmessung zugeführt.

Tabellen im Ergebnisteil zeigen die weitere Verwendung des Untersuchungsmaterials und geben Auskunft über die gepoolten Proben.

3.4. Die Präparation des Lungengewebes

Bei der Präparation des fetalen Lungengewebes muß besonders darauf geachtet werden, daß Pleura, Gefäße und knorpelige Strukturen, wie Bronchien, vom Lungenparenchym abgetrennt werden.

Nach BOYDEN, E. (27) sind Knorpelwachstum und Auswachsen der Bronchien, Bronchiolen und Alveolen abhängig vom Entwicklungsalter. Bei einem $5\frac{6}{12}$ Monate alten Kind wird der tiefste Knorpel am 10. Zweig des anteromedialen Bronchus gefunden. Bei zunehmendem Wachstum verlagert er sich peripher, so daß angenommen werden darf, daß bei Feten die knorpeligen Strukturen auf Stammbronchien und erste Verzweigungen begrenzt sind. So kann ein gutes Abpräparieren dieser Strukturen und den mit ihnen zusammen verlaufenden Gefäßen erreicht werden.

3.5. Die Aufbereitung des Untersuchungsmaterials für die weitere Bearbeitung

3.5.1. Die Trocknung der Proben (4, 243)

Nach der Präparation des Lungenparenchyms erfolgt die Dehydrierung und Entfettung der Proben in einem Aceton-Äther-Gemisch im Verhältnis 1:1 nach ANTONOPOULOS, C.A. et al (4) und nach ŠVEJCAR, J. (243). Es folgt die Trocknung im Trockenschrank bei 60°C über 30 min.

Das Trockenmaterial, Ausgangsstoff für alle weiteren Analysen, wird möglichst fein zermahlen, um die größtmögliche Oberfläche für das Angreifen der Agenzien zu erhalten.

Alle Proben werden gewogen, für die Hydroxyprolinbestimmung eingesetzt und anschließend entsprechend ihrer Trockengewichtsmenge und ihres Kollagengehaltes weiteren Untersuchungen zugeführt. In einigen Fällen muß gepoolt werden, um die erforderliche Mindestmenge zu erreichen.

3.5.2. Die Hydroxyprolinbestimmung (236, 242)

Kollagen enthält ca. 14,4 % $\pm$ 0,24 % Hydroxyprolin, das für Kollagen spezifisch ist. Deshalb kann man zur Beurteilung des Kollagengehaltes die Bestimmung der Hydroxyprolinkonzentration heranziehen. Diese erfolgt nach einer von ŠVEJCAR, J. (242) leicht abgewandelten Methode nach STEGEMANN, H. (236) unter Verwendung folgender Reagenzien :

6	N	Salzsäure
6	N	Natronlauge
0,03	M	Chloramin-T in 3 Teilen n-Propanol und 7 Teilen Acetat-Citrat- Puffer (pH 6,0)
70	%	Perchlorsäure
5	%	Dimethylaminobenzaldehyd.

Nach Messung von Kontrollproben zeigt sich, daß die von Frau MOHRMANN erstellte Eichkurve (Abb. 13) übernommen werden kann.

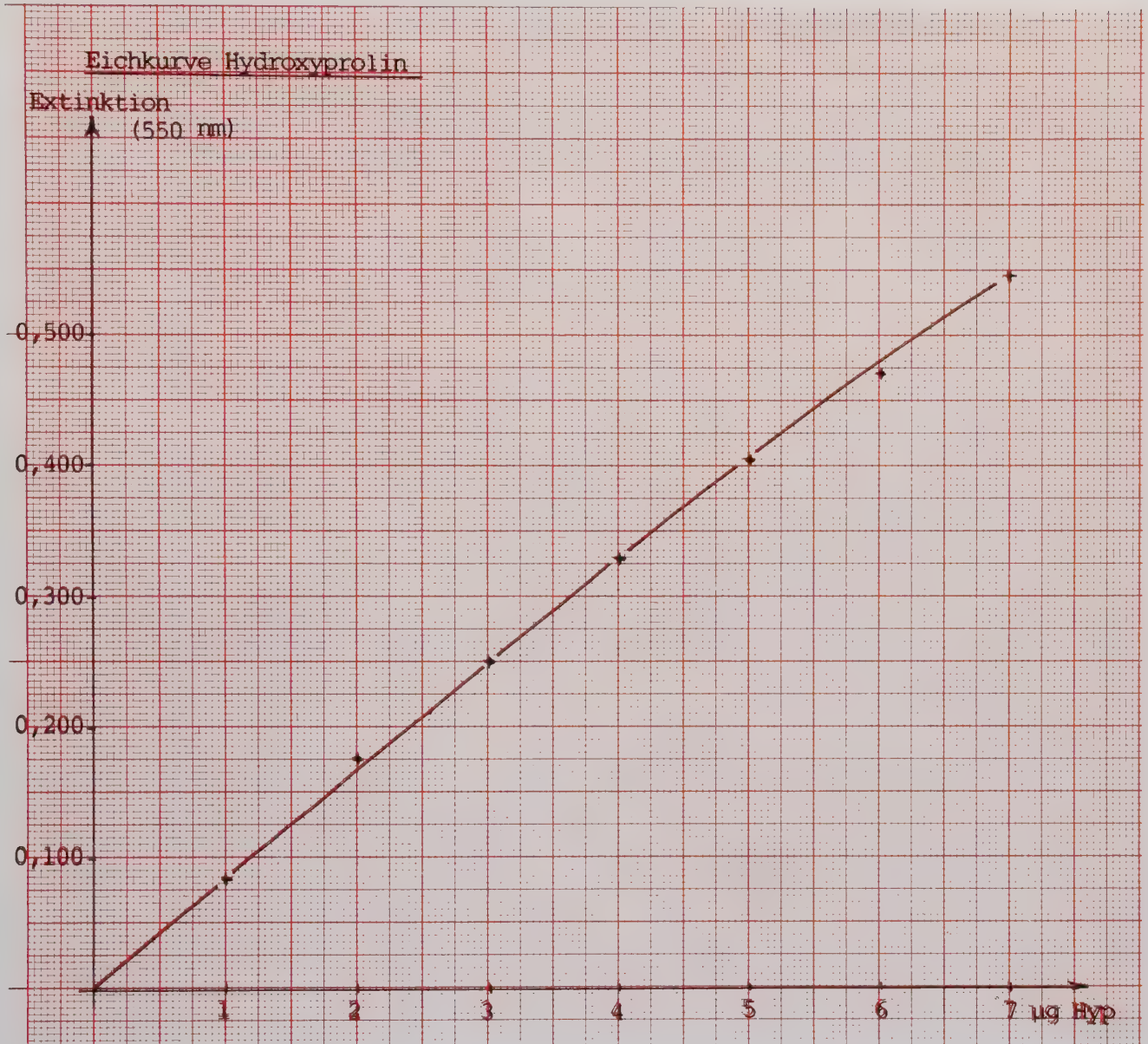


Abb. 13 Eichkurve zur Bestimmung des Hydroxyprolingehaltes erstellt von Frau MOHRMANN (1978)

Aus der Eichkurve geht hervor, daß bis zu 5 µg Hydroxyprolin eine lineare Abhängigkeit besteht. Der Geraden in diesem Bereich liegt die Funktion $f(x) = 0,08 x$ zugrunde. Die Kollagenwerte lassen sich durch Multiplikation des Hydroxyprolingehaltes mit dem Faktor 7,46 ermitteln. Die Werte sind dem Ergebnisteil zu entnehmen.

3.6. Die Kollagenspaltung durch Pepsinverdauung und
Salzfällung (178)

Zur Isolierung der Kollagentypen ist die Spaltung der Quervernetzungen notwendig. Dies geschieht durch das proteolytische Enzym Pepsin, das die Aufspaltung der terminalen Carboxy- und Amino-Verbindungen bewirkt, die helikale Konformation des Kollagens jedoch nicht angreift. Nach der von MILLER, E.J. (178) beschriebenen Methode werden die Proben zunächst 24 h bei 4°C in 0,5 M Essigsäure gewaschen und anschließend durch Zugabe von 0,1 mg Pepsin pro mg Trockengewicht in zwei Fraktionen 72 h bei 4°C und einem pH-Wert von 2,5 unter ständigem Rühren verdaut. Bei der folgenden Zentrifugation mit 15.000 U/min und 4°C über 2 mal 2 h werden klare Überstände gewonnen, die auf Kollagen mit 0,9 M NaCl gefällt werden (bei 4°C und über 12 h). Der Rückstand R₀ wird wie das nach der Salzfällung entstandene und unter bekannten Bedingungen abzentrifugierte Präzipitat in 0,5 M Essigsäure gelöst und 2 Tage gegen 0,1 M Essigsäure dialysiert. Die Dialysate werden erneut 2 h zentrifugiert (4°C und 15.000 U/min), anschließend 24 h lyophilisiert und der Kollagengehalt bestimmt.

Der Ablauf des Analyseverfahrens wird im folgenden Fließdiagramm (Abb.14) zusammengefaßt. Das Diagramm wird zur Verdeutlichung von Analysengang und -ergebnis für jede Probe im Ergebnisteil angefertigt.

Abb. 14 Fließdiagramm :
Kollagenspaltung ohne isolierte Darstellung der
Kollagentypen I und III
Autor, modifiziert nach EWERT, E. (76)

Abb. 14

Probe wird in 0,5 M Essigsäure 24 h bei 4°C gewaschen

Pepsin-Verdauung :

0,1 mg Pepsin/mg TG in 2 Fraktionen (2 mal 0,05 mg Pepsin/mg TG)
72 h bei 4°C und pH = 2,5 rühren
2h zentrifugieren (15.000 U/min und 4°C)
Überstand abgießen, Rückstand mit 0,5 M Essigsäure spülen,
2 h zentrifugieren (15.000 U/min und 4°C)
Überstände poolen,
auf Kollagen fällen

Rückstand R₀ lyophilisieren (24 h)
TG in mg und Kollagengehalt in % bestimmen

Salzfällung :

gepoolte Überstände (Ü) mindestens 1 Nacht mit 0,9 M NaCl (52,6 mg NaCl/ml Ü) bei 4°C auf Kollagen fällen

Präzipitat 2 h mit 15.000 U/min und bei 4°C abzentrifugieren

abzentrifugiertes Präzipitat in 0,5 M Essigsäure lösen und 2 Tage gegen 0,1 M Essigsäure dialysieren

dialysierte Proben erneut 2 h mit 15.000 U/min und bei 4°C zentrifugieren

klarer Überstand mindestens 24 h lyophilisieren, TG und Kollagengehalt bestimmen

SSW :

Proben-Nr.

Kollagen :

Pepsin-Verdauung :

Einsatz : mg

Kollagen : %

R₀ gepoolt :

TG : mg

Kollagen : %

Salzfällung :

mit M NaCl

Ü : ml

NaCl : mg

2 h zentrifugieren

Dialyse gegen 0,1 M Essigsäure

2 h zentrifugieren

TG : mg

Kollagen : %

3.7. Die Isolierung der Kollagentypen I und III durch
Pepsinverdauung und Salzfällung (176)

Die Isolierung der Kollagentypen zur getrennten Darstellung der Typen I und III erfolgt zunächst in den in Kapitel 3.6. besprochenen Schritten mit Pepsinverdauung und 1. Salzfällung nach MILLER, E.J. (176). Nach dem Zentrifugieren mit 15.000 U/min über 2 h bei 4°C, dem Lösen des Präzipitats und der Dialyse gegen 0,05 M Tris-HCl/1 M NaCl-Puffer bei einem pH-Wert von 7,5 und bei 4°C, erfolgt die erneute Zentrifugation unter bekannten Bedingungen. Die abgesetzten Rückstände werden in 0,5 M Essigsäure gelöst, wie die klaren Überstände gegen 0,5 M Essigsäure dialysiert (48 h bei 4°C) und anschließend lyophilisiert. Die folgende Bestimmung von Trockengewicht und Kollagengehalt gibt Auskunft über die Reinigung des Kollagens aus der Ausgangssubstanz. Das Lyophilisat wird in 0,05 M Tris-HCl/1 M NaCl - Puffer (pH = 7,5, bei 4°C) gelöst und unter bekannten Bedingungen abzentrifugiert. Über Nacht wird der klare Überstand auf 5 M NaCl gefällt, das Präzipitat wird abzentrifugiert und wie der bei der vorherigen Zentrifugation gewonnen Rückstand in 0,5 M Essigsäure bei 4°C gelöst. Beide Fraktionen werden sorgfältig (mindestens 48 h) gegen Aqua dest. dialysiert und anschließend 24 h lyophilisiert. Es folgt die Bestimmung von Trockengewicht und Kollagengehalt, bevor beide für weitere Analysengänge eingesetzt werden.

Auch dieser komplizierte Analysengang wird im folgenden Fließdiagramm (Abb. 15) verdeutlicht. Es faßt im Ergebnisteil Analysengang und Ergebnisse für jede einzelne Probe zusammen.

Abb. 15 Fließdiagramm :
Kollagenspaltung und Isolierung der Kollagen-
typen I und III
Autor, modifiziert nach EWERT, E. (76)

Abb. 15

Probe wird in 0,5 M Essigsäure
24 h bei 4°C gewaschen

Pepsinverdauung :

0,1 mg Pepsin/mg TG in 2 Fraktio-
nen, 72 h bei 4°C und pH = 2,5
2 h zentr. (15.000 U/min, 4°C),
Rückstand R₀ in 0,5 M Essigsäure
lösen, 2 h zentr., Überstände
poolen und auf Kollagen fällen

Salzfällung :

gepoolte Überstände (Ü) über
1 Nacht mit 0,9 M NaCl (52,6 mg
NaCl/ml Ü) bei 4°C auf Kollagen
fällen

Präzipitat 2 h zentr.

abzentr. Präzipitat lösen in u.
dialysieren gegen 0,05 M Tris-
HCl/1M NaCl (pH=7,5) bei 4°C

Dialysat 2 h zentr.

Überstand gegen 0,5 M Essigsäure
bei 4°C dialysieren

Rückstand R₁ lösen in und dialy-
sieren gegen 0,5 M Essigsäure

beide Fraktionen lyophilisieren

Salzfällung :

Lyophilisat von Ü in 0,05 M
Tris-HCl/1 M NaCl-Puffer
lösen (pH = 7,5)

Präzipitat 2 h zentr.

Schritte zur Iso-
lierung v. Typ I

Ü über Nacht auf 5M
NaCl (+ 4 M NaCl
fällen

2 h zentrifugieren

Präzipitat lösen in
0,5 M Essigsäure u.
Dial. g. H₂O dest.

24 h lyophilisieren

3. Salzfällung
mit 5 M NaCl
Ü : ml
NaCl: mg

2 h zentr.

Dialyse g. H₂O

lyophilis.

Koll. Typ I
TG mg
Koll. %

SSW :
Proben-Nr.
Kollagen : %

Pepsinverdauung :
Einsatz mg
Kollagen %

1. Salzfällung :
mit M NaCl
Ü : ml
NaCl mg

2 h zentrifugieren

Dialyse gegen 0,05 M
Tris-HCl/1 M NaCl

2 h zentrifugieren

Dialyse gegen 0,5 M
Essigsäure

24 h lyophilis.

Überstand :
TG : mg
Kollagen : %

2. Salzfällung :
Einsatz : mg
Kollagen %

2 h zentrifugieren

Dialyse g. H₂O

lyophilis.

Koll. Typ III
TG mg
Koll. %

R₀ gepoolt :
TG : mg
Koll.: %

R₁ :
TG : mg
Koll.: %

Schritte zur Iso-
lierung v. Typ III

Rückstand R₂ lösen in
0,5 M Essigsäure und
Dial. g. H₂O dest.

24 h lyophilisieren

3.8. Weitere Verfahren zur qualitativen und quantitativen Erfassung der Kollagentypen I und III in der fetalen Lunge

3.8.1. Die Cyanogenbromid-Spaltung (72, 116, 178, 244)

Kollagen als unlösliches Produkt kann im wesentlichen nur durch Kollagenasen gespalten werden. Ein Abspalten großer, aus ca. 1000 Aminosäuresequenzen bestehender, Moleküle kann durch die Trennung von Methioninbrücken durch Cyanogenbromid (CNBr) erreicht werden. Die Anordnung der Methioninbrücken ist vom Kollagentyp abhängig, so daß Kettenbruchstücke unterschiedlicher Länge gebildet werden, die in der Elektrophorese charakteristische Wanderstrecken zurücklegen.

Diese Methode wird folgendermaßen durchgeführt.

In einem kleinen Erlenmeyerkolben wird 70 % Ameisensäure angesetzt und 30 sec mit Stickstoff (N₂) begast. Nach Zugabe von 0,2 g Cyanogenbromid wird Methionin in einem molaren Verhältnis von 150:1 hinzugefügt, um überschüssiges CNBr zu binden. Aus dieser Lösung wird die erforderliche Menge zum Lösen des Kollagens (6 mg Probe/ml Lsg.) herauspipettiert. Jeder Ansatz wird erneut 30 sec begast und anschließend unter ständigem Rühren im Wasserbad bei 30°C über 5 h inkubiert.

Im weiteren Verlauf werden die Proben bei 15.000 U/min und 4°C 30 min zentrifugiert und über eine Biogel-Säule (P₂: 100 - 200 Maschen) gereinigt. Dabei wird überschüssige Ameisensäure, Methionin und Cyanogenbromid in Abhängigkeit ihrer Molekülgröße getrennt.

Die Säule wird mit entlüfteter 0,1 M Essigsäure äquilibriert. Bei dieser modifizierten Methode von ŠVEJCAR, J. (244) nach EYRE, D.R., HERBAGE, D. et al und MILLER, E.J. (72, 116, 178) werden Fraktionen zu 4 ml gesammelt, ihr pH-Wert gemessen und im Anschluß daran ihre Extinktion bei einer Wellenlänge von 230 nm bestimmt.

Die Fraktionen nach Reinigung enthalten :

Fraktionen	1 - 3	0,1 M Essigsäure (Puffer),
Fraktionen	4 - 6	an CNBr-gebundenes Kollagen,
Fraktion	7	geringer Kollagenanteil und 70 % Ameisensäure,
Fraktionen	8 - 10	70 % Ameisensäure,
Fraktionen	11 - 12	0,1 M Essigsäure (Puffer).

Das Auftreten der Pufferlösung in den Fraktionen 11, 12 und im Rest ist ein Kriterium für die vollständige Reinigung der Säule von der Probe.

Die Kollagen-enthaltenden Proben werden anschließend gepoolt, 24 h lyophilisiert und ihr Kollagengehalt bestimmt, bevor sie in die Elektrophorese eingesetzt werden.

3.8.2. Die Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese und die Densitometrie (45, 77, 135, 172)

Die Darstellung der Cyanogenbromid-Peptide erfolgt unter Verwendung der Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese mit Natriumdodecylsulfat. In Anlehnung an KING und LAEMMLI (135) wird sie mit einem 3 % Sammelgel und einem 12 % Trenngel an der Apparatur HAVANA der Firma DESAGA durchgeführt. Durch diskontinuierliche Puffersysteme und unterschiedliche Gelvernetzungsgrade werden die CNBr-Peptide entsprechend ihren Molekulargewichten bei konstanter Stromstärke getrennt. Es ergeben sich für jeden Kollagentyp charakteristische Bandenmuster, die mit Coomassie-Blau nach FAIRBANKS (77) angefärbt werden. Die angefärbten Gele werden entfärbt, so daß die Banden deutlich hervortreten, da sie die Farbe besser halten als das Gel selbst.

Anschließend werden die Gele fotografiert und ihre Banden mit dem Densitometer DD2 der Firma KIPP & ZONEN registriert. Die so gewonnenen Ergebnisse zeigt Kapitel 4 dieser Arbeit.

Die charakteristischen Banden der CNBr-Peptide von den Kollagentypen I und III verdeutlicht die unten stehende Abbildung.

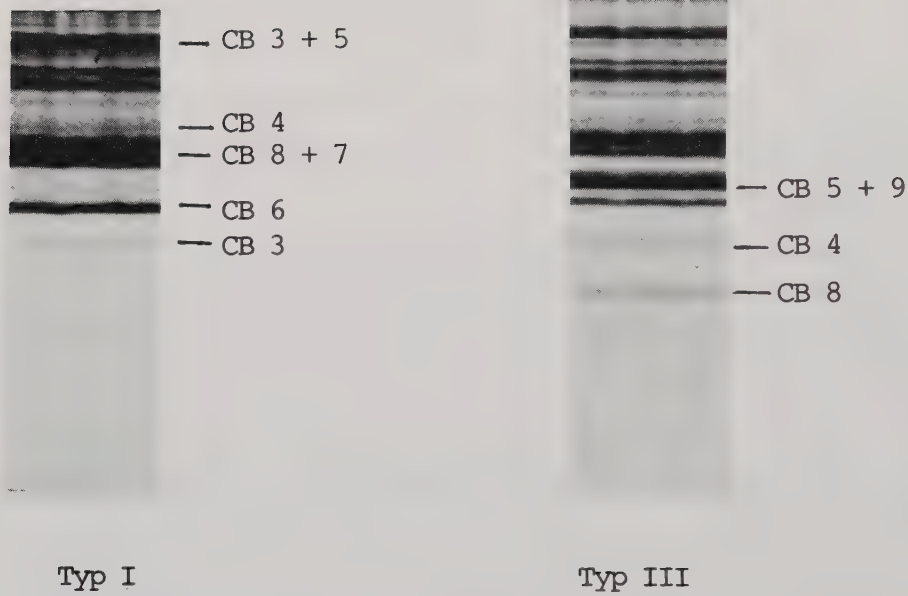


Abb. 16 Die charakteristischen Bandenmuster der Kollagentypen I und III nach Cyanogenbromid-Spaltung

4. Die Arbeitsergebnisse

Um vergleichbare Elektrophoresen und Densitogramme zu erhalten, werden die Proben in Abhängigkeit von der zur Verfügung stehenden Menge Lungengewebe, dem ermittelten Kollagengehalt des Ausgangsmaterials, dem wahrscheinlichen, angeglichenen Gestationsalters und den zum Teil vorliegenden pathologischen Veränderungen in drei Gruppen unterteilt. Sie werden unterschiedlichen Methoden zugeführt. Diese Einteilung wird der Darstellung der Ergebnisse zugrunde gelegt.

4.1. Der Kollagengehalt des Ausgangsmaterials

Alle 45 fetalen Lungenproben werden zunächst zur Beurteilung ihres Kollagengehaltes der Hydroxyprolinbestimmung zugeführt.

Sechs Proben können wegen erheblichen pathologischen Veränderungen oder eines sehr geringen Kollagendehaltes bei nur sehr kleinen Mengen Trockengewicht nicht weiter verarbeitet werden. Sie sind in den folgenden Tabellen mit *) markiert. Alle anderen Proben werden je nach vorliegender Menge an Trockensubstanz der Kollagenspaltung und Gesamtdarstellung der Kollagentypen oder der Kollagenspaltung mit Isolierung der Kollagentypen I und III zugeführt.

Die folgenden Tabellen (Tab. 14 - Tab. 17) zeigen den Kollagengehalt aller Ausgangsproben in Prozent in Abhängigkeit ihrer Lungenentwicklungsperiode.

4.1.1. Der Kollagengehalt des Ausgangsmaterials in der
pseudoglandulären Periode (8. - 17. SSW)

Proben-Nr.	SSW	SFL in mm	Kollagen in %
1	14	115	2,77
2	15	136	4,03
3	16	140	3,38
4	16	140	2,31
5	17	172	3,42

Tab. 14 Übersicht über den Kollagengehalt des Ausgangsmaterials der pseudoglandulären Periode

4.1.2. Der Kollagengehalt des Ausgangsmaterials in der
kanalikulären Periode (18. - 25. SSW)

Proben-Nr.	SSW	SFL in mm	Kollagen in %
6*	18	186	4,20
7*	18	194	4,56
8*	18	198	2,39
9*	19	200	4,95
10	19	210	2,83
11	19	218	4,37
12	20	240	5,32
13	20	240	3,87
14	20	240	3,40
15*	21	250	12,21
16	21	260	5,90
17	21	260	5,42
18	21	260	6,77
19	22	270	8,93
20	22	270	3,17
21	24	300	10,17

Proben-Nr.	SSW	SFL in mm	Kollagen in %
22	25	310	5,40
23	25	310	4,96

Tab. 15 Übersicht über den Kollagengehalt des Ausgangsmaterials der kanalikulären Periode

4.1.3. Der Kollagengehalt des Ausgangsmaterials in der
terminalen Periode (26. SSW - Geburt)

Proben-Nr.	SSW	SFL in mm	Kollagen in %
24	26*	218	15,02
25	26*	310	12,49
26	26	320	11,80
27	26	320	7,30
28	27 + 4 Im	430	10,73
29	27	330	10,67
30	27	340	9,27
31	28	350	7,06
32	29	370	6,07
33	29	370	5,03
34	29	375	7,75
35	32	410	6,44
36	37	470	8,21
37	37	470	6,14
38	37	470	7,78
39	Termin	500	8,66
40	Termin	500	9,41
41	Termin	530	8,60

Tab. 16 Übersicht über den Kollagengehalt des Ausgangsmaterials in der terminalen Periode
(bei den mit * markierten Proben handelt es sich um Anencephali, bei Probe 28 um eine Frühgeburt, die 4 Monate lebte)

4.1.4. Der Kollagengehalt des Ausgangsmaterials in der
alveolären Periode (späte Fetalzeit - 8. Lj.)

Proben-Nr.	Alter :	SFL in mm	Kollagen in %
42	Termin	540	11,33
43	2. Lm.	560	10,16
44	3. Lm. + 3 Wo.	580	7,13
45	4. Lm.	600	18,85

Tab. 17 Übersicht über den Kollagengehalt des Ausgangsmaterials in der alveolären Periode

Die in den Tabellen erfaßten Kollagenmengen werden in der folgenden Abbildung in Abhängigkeit ihrer Schwangerschaftswoche bzw. ihres Lebensalters graphisch dargestellt.

Anhand der errechneten Mittelwerte ($\bar{x}$) der einzelnen Lungenentwicklungsperioden ergibt sich eine Kurve, die die Zunahme des Gesamtkollagengehaltes mit fortschreitendem Gestationsalter verdeutlicht. Es fallen einige Werte von Proben heraus, die entweder pathologisch-morphologisch Veränderungen aufweisen oder die durch ein abweichendes Trennungsverhalten auffallen.

Legende zu Abb. 17 :

- + Proben mit unauffälliger Morphologie und unauffälligem Trennungsverhalten
- * Proben mit pathologischem Befund oder verändertem Verhalten
- geschätzter Durchschnitt des Kollagengehaltes der einzelnen Lungenentwicklungsperioden

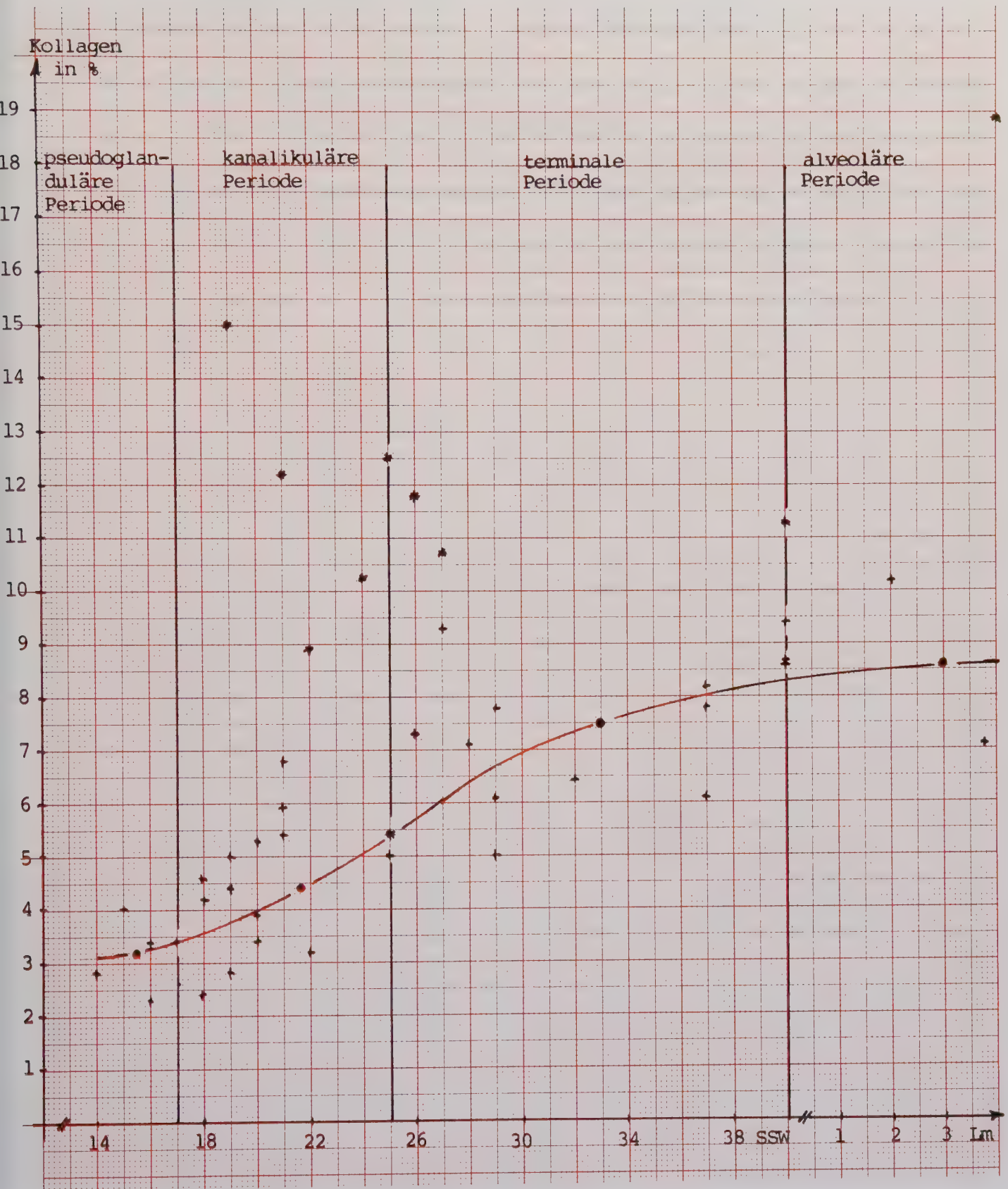


Abb. 17 Der Kollagengehalt des Ausgangsmaterials in Abhängigkeit der Schwangerschaftsdauer und Lungenentwicklungsperiode

4.2. Das Verhalten der Proben nach Kollagenanreicherung
und Kollagenspaltung

In dieser Gruppe werden Proben berücksichtigt, die auch nach dem Poolen vergleichbarer Schwangerschaftswochen und Kollagengehalte im Ausgangsmaterial weniger als 1000 mg Trockensubstanz ergeben. Meist handelt es sich um das Gewebe junger Feten. Es wird versucht, Proben mit veränderter Morphologie oder mit einem sehr hohen Kollagengehalt als Einzelprobe einzusetzen und getrennt zu behandeln.

Die folgende Tabelle (Tab. 18) zeigt die in dieser Gruppe berücksichtigten Proben, den Kollagengehalt der Einzelprobe, die Zusammenstellung zum Poolen sowie den Kollagengehalt der gepoolten Proben in Abhängigkeit ihres Gestationsalters.

Versuchsablauf und Ergebnisse werden anschließend für jede Probe besprochen.

Nr. :	Proben-Nr.	SSW	Kollagen in % Einzelpr.	Kollagen in % gepoolte Pr.
1 [#]	1	14	2,77	
	2	15	4,03	
	3	16	3,38	3,28
	4	16	2,31	
	5	17	3,42	
2 [#]	10	19	2,83	
	11	19	4,37	4,13
	12	20	5,32	
3 [#]	11	19	4,37	
4 [#]	13	20	3,87	
	14	20	3,40	3,70

Nr. :	Proben-Nr.	SSW	Kollagen in % Einzelpr.	Kollagen in % gepoolte Pr.
5 [#]	17	21	5,42	
6 [#]	16	21	5,90	
	17	21	5,42	5,31
	18	21	6,77	
7 [#]	20	22	3,17	
	23	25	4,96	4,02
8 [#]	21	24	10,17	
9 [#]	27	26	7,31	
10 [#]	29	27	10,67	
11 [#]	30	27	9,27	
12 [#]	28	27 + 4 Im.	10,73	
13 [#]	31	28	7,06	
	34	29	7,75	7,13
14 [#]	38	37	7,78	

Nr. :	Proben-Nr.	SSW	Kollagen in % Einzelpr.	Kollagen in % gepoolte Pr.
15 [#]	40	Termin	9,41	8,74
	41	Termin	8,60	
16 [#]	43	2. Lm.	10,16	
17 [#]	45	4. Lm.	18,85	

Tab. 18 Übersicht über die zur Kollagenspaltung und Gesamtdarstellung der Kollagentypen eingesetzten Proben, ihr Kollagengehalt und Zusammenstellung der gepoolten Proben sowie deren Kollagengehalt.

Im folgenden werden die Analysenprotokolle für jede einzelne Probe sowie ein Fließschema, das den Analysengang verdeutlicht, aufgeführt.

Probe 1[#] :

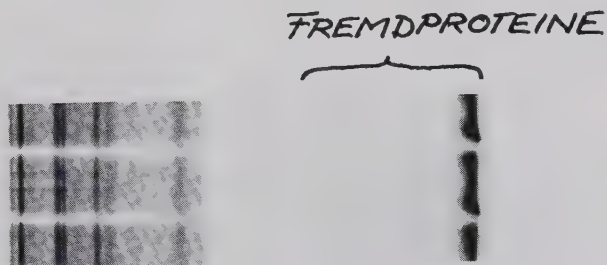
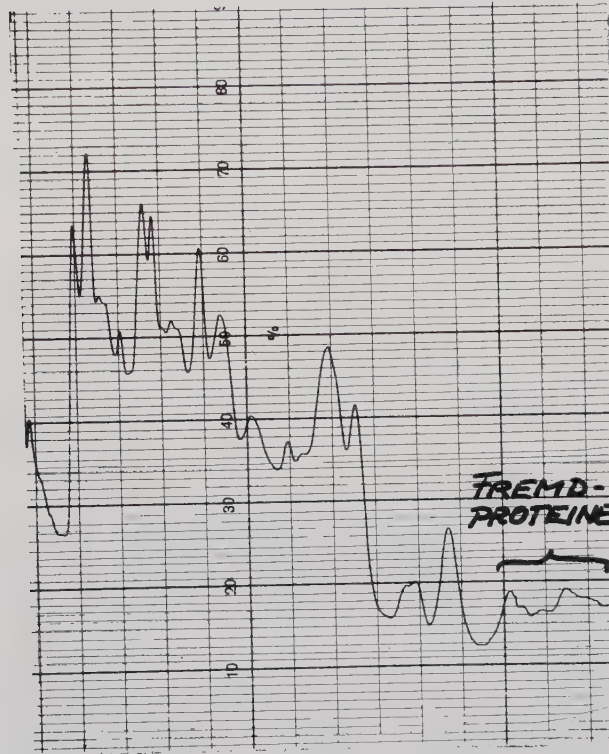
Es handelt sich um eine gepoolte Probe, der 14. - 17. SSW. Die Präparate zeigen keinen pathologischen Lungenbefund.

Nach der Pepsinverdauung wirkt diese Probe sehr flüssig. Zur Salzfallung nach Zentrifugation (15.000 U/min, 4°C, 2 x 2h) werden 3 M NaCl eingesetzt. Der nach erneuter Zentrifugation unter bekannten Bedingungen gewonnene Rückstand löst sich nur schwer in 0,5 M Essigsäure. Er wird gegen 0,1 M Essigsäure dialysiert und anschließend wie R₀ (Rückstand nach Pepsinverdauung) lyophilisiert. Es zeigt sich eine unvollständige Trennung, so daß ein deutlicher Kollagenrest auf R₀ beobachtet werden kann.

Bei der anschließenden Cyanogenbromid-Spaltung ergibt sich

eine Trübung der Kollagenfraktionen.

Elektrophorese und Densitometrie lassen einen hohen Anteil an Fremdproteinen erkennen. In ihm scheint die CB-8-Bande des Typ III-Kollagens unterzugehen.



Die Probe wird in 0,5 M Essigsäure 24 h bei 4°C gewaschen

Pepsin-Verdauung :

0,1 mg Pepsin/mg TG in 2 Fraktionen (2 mal 0,05 mg Pepsin/mg TG)
72 h bei 4°C und pH = 2,5 rühren
2 h zentrifugieren (15.000 U/min und 4°C)
Überstand abgießen, Rückstand mit 0,5 M Essigsäure spülen
2 h zentrifugieren (15.000 U/min und 4°C)
Überstände poolen, auf Kollagen fällen

Rückstand R. lyophilisieren (24 h)
TG in mg und Kollagengehalt in % bestimmen

Salzfällung :

gepoolte Überstände (Ü) mindestens 1 Nacht mit 0,9 M NaCl (52,6 mg NaCl/ml Ü) bei 4°C auf Kollagen fällen

Präzipitat 2 h mit 15.000 U/min und bei 4°C abzentrifugieren

abzentrifugiertes Präzipitat in 0,5 M Essigsäure lösen und 2 Tage gegen 0,1 M Essigsäure dialysieren

dialysierte Proben erneut mit 15.000 U/min und bei 4°C zentrifugieren

klaren Überstand mindestens 24 h lyophilisieren, TG und Kollagengehalt bestimmen

SSW	:	14. - 17.
Proben-Nr.	:	1 [#]
Kollagen	:	3,28 %

Pepsin-Verdauung	:	
Einsatz	:	500 mg
Kollagen	:	3,28 %

R. gepoolt	:	
TG	:	178,02 mg
Kollagen	:	5,87 %

Salzfällung	:	
mit	:	3 M NaCl
Ü	:	36 ml
NaCl	:	6311,52 mg

2 h zentrifugieren

Dialyse gegen 0,1 M Essigsäure

2 h zentrifugieren

TG	:	12,00 mg
Koll.	:	11,134 %

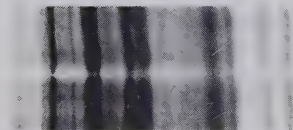
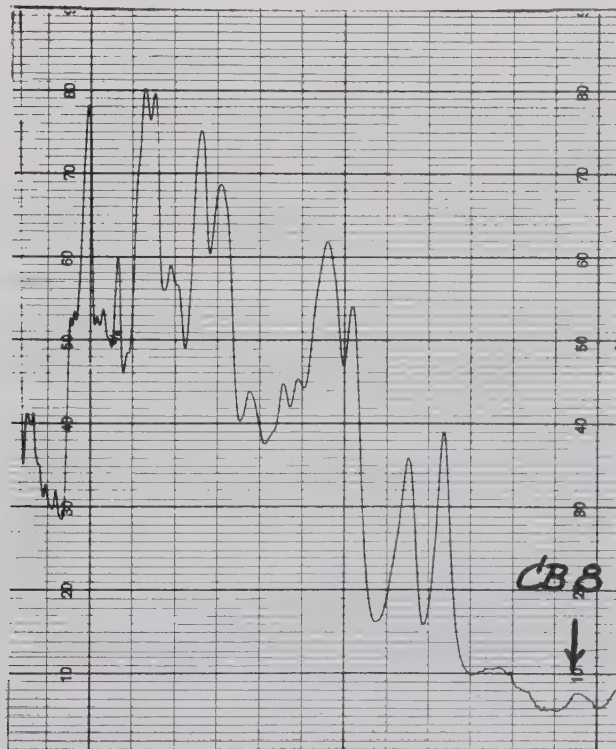
Probe 2[#] :

Bei dieser Probe handelt es sich um gepooltes Material der 19. Schwangerschaftswoche ohne Anhalt für Lungenmißbildungen. Ihr Trennungsverhalten ähnelt dem der Probe Nr. 1[#]. Auch hier ist eine höhere Konzentration an Natriumchlorid (2 M NaCl) zum Ausfällen von Kollagen erforderlich. Der weitere Analysenverlauf ist erwartungsgemäß.

Erneut kann nach dem Lyophilisieren der dialysierten Probe sowie des Rückstandes nach Pepsin-Verdauung R₀ eine unvollständige Trennung kollagener und nicht-kollagener Anteile beobachtet werden.

Die Fraktionen 4, 5 und 6 der Reinigung nach Cyanogenbromid-Spaltung zeigen wie bei der vorher beschriebenen Probe eine Trübung.

In der Elektrophorese läßt sich ein deutlich geringerer Anteil an Fremdproteinen im Vergleich zu Probe 1[#] nachweisen.



Die Probe wird in 0,5 M Essigsäure 24 h bei 4°C gewaschen

Pepsin-Verdauung :

0,1 mg Pepsin/mg TG in 2 Fraktionen (2 mal 0,05 mg Pepsin/mg TG) 72 h bei 4°C und pH = 2,5 rühren
2 h zentrifugieren (15.000 U/min und 4°C)
Überstand abgießen, Rückstand mit 0,5 M Essigsäure spülen,
2 h zentrifugieren (15.000 U/min und 4°C)
Überstände poolen, auf Kollagen fällen

Rückstand R₀ lyophilisieren (24h)
TG in mg und Kollagengehalt in % bestimmen

Salzfällung :

gepoolte Überstände (Ü) mindestens 1 Nacht mit 0,9 M NaCl (52,6 mg NaCl/ml Ü) bei 4°C auf Kollagen fällen

Präzipitat 2 h mit 15.000 U/min und bei 4°C abzentrifugieren

abzentrifugiertes Präzipitat in 0,5 M Essigsäure lösen und 2 Tage gegen 0,1 M Essigsäure dialysieren

dialysierte Proben erneut mit 15.000 U/min und bei 4°C zentrifugieren

klaren Überstand mindestens 24 h lyophilisieren, TG und Kollagengehalt bestimmen

SSW	19.
Proben-Nr.	2 [#]
Kollagen :	4,13 %

Pepsin-Verdauung :	
Einsatz :	450 mg
Kollagen :	4,13 %

R ₀ gepoolt :	
TG :	137,28 mg
Kollagen :	4,88 %

Salzfällung :	
mit	2 M NaCl
Ü :	38 ml
NaCl :	4441,44 mg

2 h zentrifugieren

Dialyse gegen 0,1 M Essigsäure

2 h zentrifugieren

TG :	13,01 mg
Koll.	46,87 %

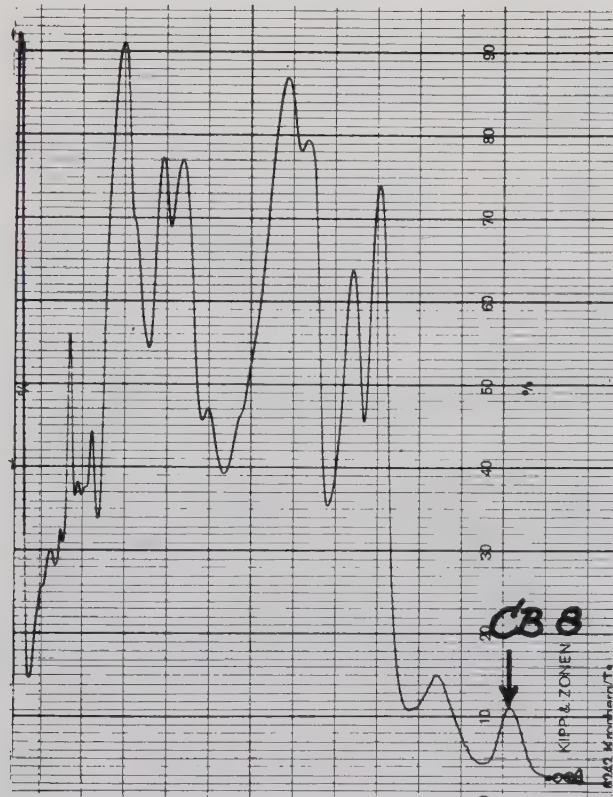
Probe 3[#] :

Diese Probe aus der 19. SSW zeigt das erwartete Trennungsverhalten. Zur Salzfällung sind nur 0,9 M NaCl erforderlich.

Makroskopisch vollständig erscheint die Trennung des Kollagens vom Rückstand R₀ nach dem Lyophilisieren.

Bei der Cyanogenbromidspaltung fällt jedoch in den entsprechenden Kollagenfraktionen eine deutliche Trübung auf.

In Elektrophorese und Densitometrie kann eine gute Darstellung der für den Kollagentyp III charakteristischen CB-8-Bande erreicht werden. Ein Fremdproteinanteil läßt sich nicht mehr nachweisen.



Die Probe wird in 0,5 M Essigsäure 24 h bei 4°C gewaschen

Pepsin-Verdauung :

0,1 mg Pepsin/mg TG in 2 Fraktionen (2 mal 0,05 mg Pepsin/mg TG) 72 h bei 4°C und pH = 2,5 rühren
2 h zentrifugieren (15.000 U/min und 4°C)
Überstand abgießen, Rückstand mit 0,5 M Essigsäure spülen,
2 h zentrifugieren (15.000 U/min und 4°C)
Überstände poolen, auf Kollagen fällen

Rückstand R₀ lyophilisieren (24 h)
TG in mg und Kollagengehalt in % bestimmen

Salzfällung :

gepoolte Überstände (Ü) mindestens 1 Nacht mit 0,9 M NaCl (52,6 mg NaCl/ml Ü) bei 4°C auf Kollagen fällen

Präzipitat 2 h mit 15.000 U/min und bei 4°C abzentrifugieren

abzentrifugiertes Präzipitat in 0,5 M Essigsäure lösen und 2 Tage gegen 0,1 M Essigsäure dialysieren

dialysierte Proben erneut mit 15.000 U/min und bei 4°C zentrifugieren

klaren Überstand mindestens 24 h lyophilisieren, TG und Kollagengehalt bestimmen

SSW	:	19.
Proben-Nr.	:	3 [#]
Kollagen	:	4,37 %

Pepsin-Verdauung	:	
Einsatz	:	500 mg
Kollagen	:	4,37 %

R ₀ gepoolt	:	
TG	:	143,34 mg
Kollagen	:	4,79 %

Salzfällung	:	
mit	:	0,9 M NaCl
Ü	:	25 ml
NaCl	:	1315,0 mg

2 h zentrifugieren

Dialyse gegen 0,1 M Essigsäure

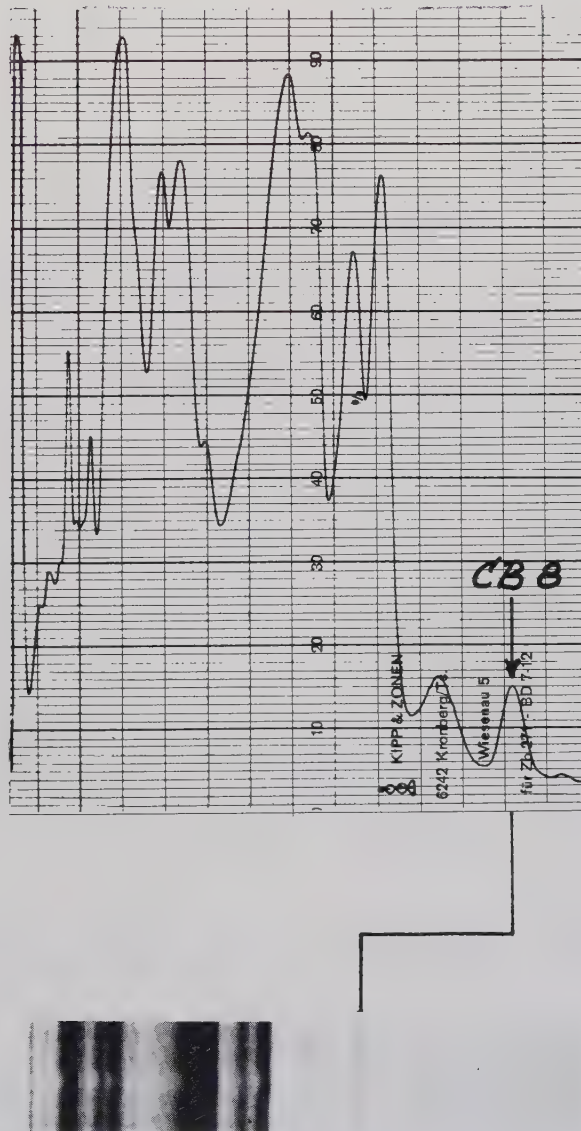
2 h zentrifugieren

TG	:	12,37 mg
Koll.	:	70,22 %

Probe 4[#] :

Hierbei handelt es sich um Lungengewebe von Feten der 20. Schwangerschaftswoche. Die Probe zeigt das erwartete Trennungsverhalten.

In den Fraktionen 4 - 6 der Reinigung über Biogel-Säule nach Cyanogenbromid-Spaltung findet man noch eine leichte Trübung. Elektrophorese und Densitometrie lassen keine Abweichungen im Bandenmuster erkennen.



Die Probe wird in 0,5 M Essigsäure 24 h bei 4°C gewaschen

Pepsin-Verdauung :

0,1 mg Pepsin/mg TG in 2 Fraktionen (2 mal 0,05 mg Pepsin/mg TG)
72 h bei 4°C und pH = 2,5 rühren
2 h zentrifugieren (15.000 U/min und 4°C)
Überstand abgießen, Rückstand mit 0,5 M Essigsäure spülen
2 h zentrifugieren (15.000 U/min und 4°C)
Überstände poolen, auf Kollagen fällen

Rückstand R₀ lyophilisieren (24 h)
TG in mg und Kollagengehalt in % bestimmen

Salzfällung :

gepoolte Überstände (Ü) mindestens 1 Nacht mit 0,9 M NaCl (52,6 mg NaCl/ml Ü) bei 4°C auf Kollagen fällen

Präzipitat 2 h mit 15.000 U/min und bei 4°C abzentrifugieren

abzentrifugiertes Präzipitat in 0,5 M Essigsäure lösen und 2 Tage gegen 0,1 M Essigsäure dialysieren

dialysierte Proben erneut mit 15.000 U/min und bei 4°C zentrifugieren

klaren Überstand mindestens 24 h lyophilisieren, TG und Kollagengehalt bestimmen

SSW	:	20.
Proben-Nr.	:	4 [#]
Kollagen	:	3,70 %

Pepsin-Verdauung	:	
Einsatz	:	500 mg
Kollagen	:	3,70 %

R ₀ gepoolt	:	
TG	:	163,62 mg
Kollagen	:	2,89 %

Salzfällung	:	
mit	:	0,9 M NaCl
Ü	:	31 ml
NaCl	:	1630,6 mg

2 h zentrifugieren

Dialyse gegen 0,1 M Essigsäure

2 h zentrifugieren

TG	:	14,75 mg
Koll.	:	62,94 %

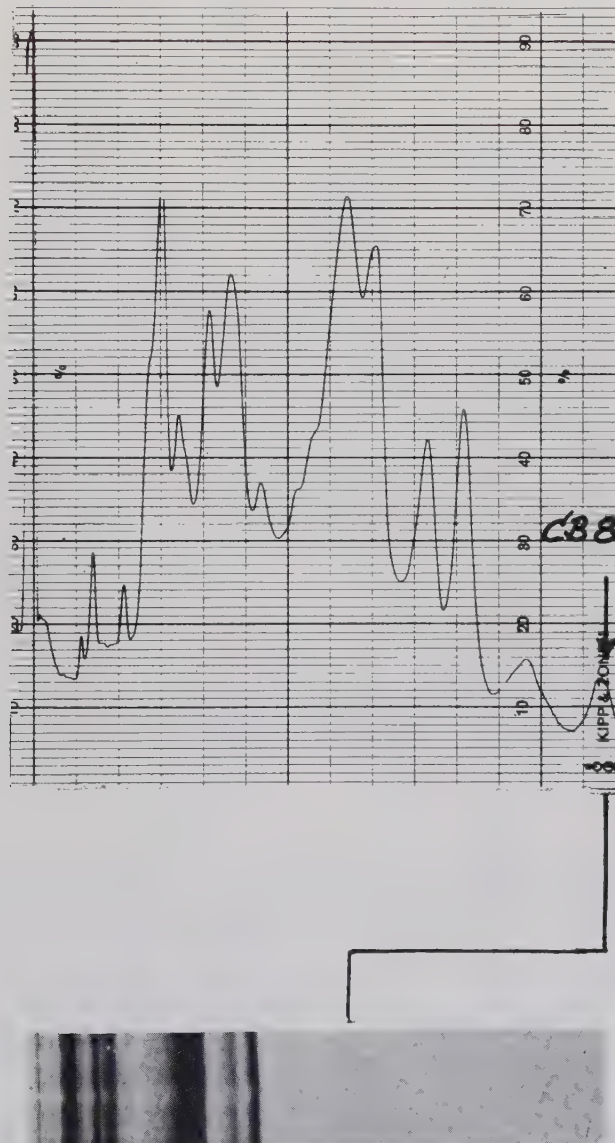
Probe 5[#] :

Es liegt das Gewebe eines Feten der 21. Schwangerschafts-
woche vor.

Es zeigt sich ein Trennungsverhalten, das eher einem jüngeren
Gestationsalter entsprechen würde. Der Rückstand R₀ läßt kol-
lagene Anteile erkennen.

Bei der Reinigung nach CB-Spaltung kann eine erhebliche Trü-
bung der Kollagenfraktionen beobachtet werden.

Ein Fremdproteinanteil kann jedoch weder in der Elektropho-
rese noch in dem Densitogramm nachgewiesen werden.



Die Probe wird in 0,5 M Essigsäure 24 h bei 4°C gewaschen

Pepsin-Verdauung :

0,1 mg Pepsin/mg TG in 2 Fraktionen (2 mal 0,05 mg Pepsin/mg TG)
72 h bei 4°C und pH = 2,5 rühren
2 h zentrifugieren (15.000 U/min und 4°C)
Überstand abgießen, Rückstand mit 0,5 M Essigsäure spülen,
2 h zentrifugieren (15.000 U/min und 4°C)
Überstände poolen, auf Kollagen fällen

Rückstand R₀ lyophilisieren (24 h)
TG in mg und Kollagengehalt in % bestimmen

Salzfällung :

gepoolte Überstände (Ü) mindestens 1 Nacht mit 0,9 M NaCl
(52,6 mg NaCl/ml Ü) bei 4°C auf Kollagen fällen

Präzipitat 2 h mit 15.000 U/min und bei 4°C abzentrifugieren

abzentrifugiertes Präzipitat in 0,5 M Essigsäure lösen und 2 Tage gegen 0,1 M Essigsäure dialysieren

dialysierte Proben erneut mit 15.000 U/min und bei 4°C zentrifugieren

klaren Überstand mindestens 24 h lyophilisieren, TG und Kollagengehalt bestimmen

SSW	:	21.
Proben-Nr.	:	5 [#]
Kollagen	:	5,42 %

Pepsin-Verdauung	:	
Einsatz	:	500 mg
Kollagen	:	5,42 %

R ₀ gepoolt	:	
TG	:	149,13 mg
Kollagen	:	4,44 %

Salzfällung	:	
mit	:	0,9 M NaCl
Ü	:	23 ml
NaCl	:	1209,8 mg

2 h zentrifugieren

Dialyse gegen 0,1 M Essigsäure

2 h zentrifugieren

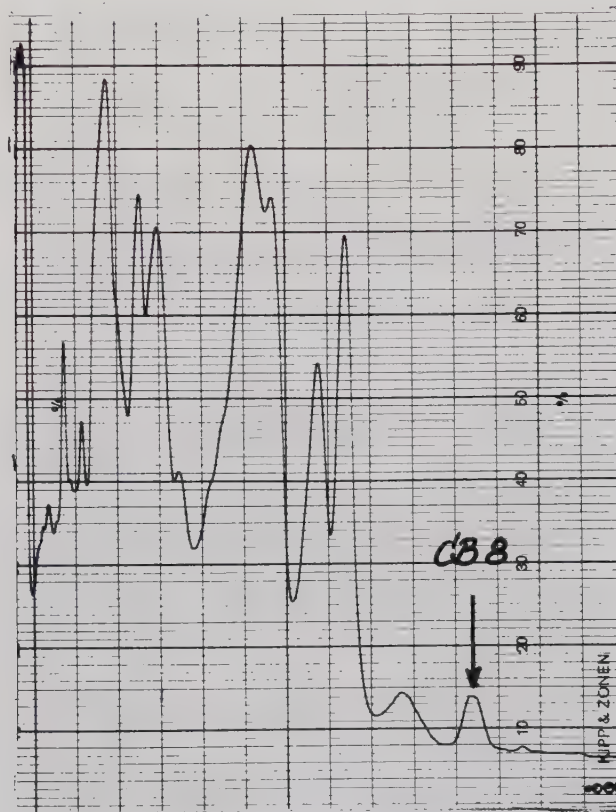
TG	:	18,57 mg
Koll.	:	66,76 %

Probe 6# :

Bei diesem Feten der 21. Schwangerschaftswoche zeigt sich ein unverändertes Trennungsverhalten und makroskopisch eine gute Trennung kollagener und nicht-kollagener Anteile.

Die CB-Fractionen 4, 5 und 6 weisen nur eine leichte Trübung auf.

Elektrophorese und Densitometrie zeigen die charakteristischen Bandenmuster.



Die Probe wird in 0,5 M Essigsäure 24 h bei 4°C gewaschen

Pepsin-Verdauung :

0,1 mg Pepsin/mg TG in 2 Fraktionen (2 mal 0,05 mg Pepsin/mg TG) 72 h bei 4°C und pH = 2,5 rühren 2 h zentrifugieren (15.000 U/min und 4°C) Überstand abgießen, Rückstand mit 0,5 M Essigsäure spülen, 2 h zentrifugieren (15.000 U/min und 4°C) Überstände poolen, auf Kollagen fällen

Rückstand R₀ lyophilisieren (24 h) TG in mg und Kollagengehalt in % bestimmen

Salzfällung :

gepoolte Überstände (Ü) mindestens 1 Nacht mit 0,9 M NaCl (52,6 mg NaCl/ml Ü) bei 4°C auf Kollagen fällen

Präzipitat 2 h mit 15.000 U/min und bei 4°C abzentrifugieren

abzentrifugiertes Präzipitat in 0,5 M Essigsäure lösen und 2 Tage gegen 0,1 M Essigsäure dialysieren

dialysierte Proben erneut mit 15.000 U/min und bei 4°C zentrifugieren

klaren Überstand mindestens 24 h lyophilisieren, TG und Kollagengehalt bestimmen

SSW	:	21.
Proben-Nr.	:	6 [#]
Kollagen	:	5,31 %

Pepsin-Verdauung	:	
Einsatz	:	500 mg
Kollagen	:	5,31 %

R ₀ gepoolt	:	
TG	:	160,32 mg
Kollagen	:	4,98 %

Salzfällung	:	
mit	:	0,9 M NaCl
Ü	:	29 ml
NaCl	:	1525,4 mg

2 h zentrifugieren

Dialyse gegen 0,1 M Essigsäure

2 h zentrifugieren

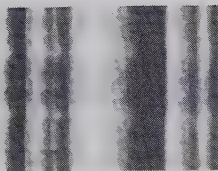
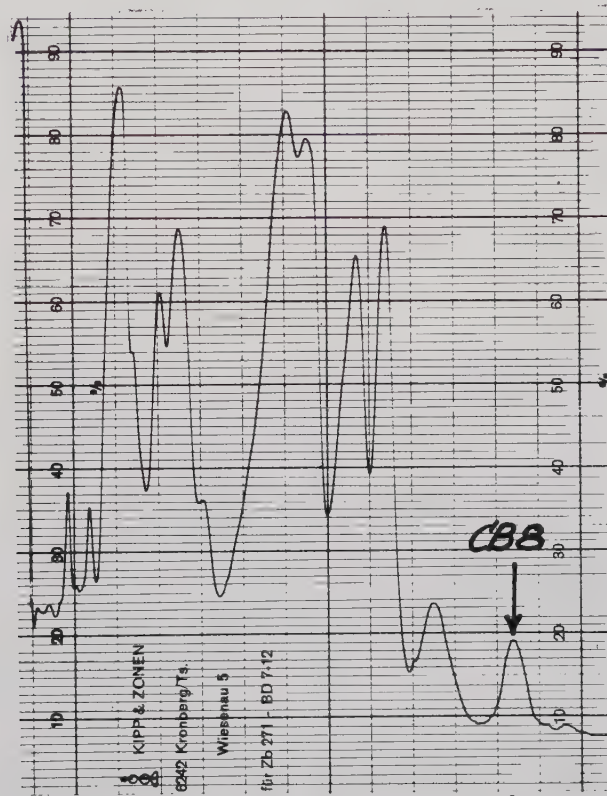
TG	:	21,06 mg
Koll.	:	60,33 %

Probe 7[#] :

Diese Probe zeigt bei der Analyse das erwartete Verhalten.

Alle Kollagenfraktionen bei der anschließenden Cyanogenbromid-Spaltung sind klar.

Elektrophorese und Densitometrie zeigen keine Abweichungen.



Die Probe wird in 0,5 M Essigsäure 24 h bei 4°C gewaschen

Pepsin-Verdauung :

0,1 mg Pepsin/mg TG in 2 Fraktionen (2 mal 0,05 mg Pepsin/mg TG) 72 h bei 4°C und pH = 2,5 rühren
2 h zentrifugieren (15.000 U/min und 4°C)
Überstand abgießen, Rückstand mit 0,5 M Essigsäure spülen,
2 h zentrifugieren (15.000 U/min und 4°C)
Überstände poolen, auf Kollagen fällen

Rückstand R₀ lyophilisieren (24 h)
TG in mg und Kollagengehalt in % bestimmen

Salzfällung :

gepoolte Überstände (Ü) mindestens 1 Nacht mit 0,9 M NaCl (52,6 mg NaCl/ml Ü) bei 4°C auf Kollagen fällen

Präzipitat 2 h mit 15.000 U/min und bei 4°C abzentrifugieren

abzentrifugiertes Präzipitat in 0,5 M Essigsäure lösen und 2 Tage gegen 0,1 M Essigsäure dialysieren

dialysierte Proben erneut mit 15.000 U/min und bei 4°C zentrifugieren

klaren Überstand mindestens 24 h lyophilisieren, TG und Kollagengehalt bestimmen

SSW	:	22. - 25.
Proben-Nr.	:	7 [#]
Kollagen	:	4,02 %

Pepsin-Verdauung	:	
Einsatz	:	500 mg
Kollagen	:	4,02 %

R ₀ gepoolt	:	
TG	:	161,46 mg
Kollagen	:	3,17 %

Salzfällung	:	
mit	:	0,9 M NaCl
Ü	:	29 ml
NaCl	:	1525,4 mg

2 h zentrifugieren

Dialyse gegen 0,1 M Essigsäure

2 h zentrifugieren

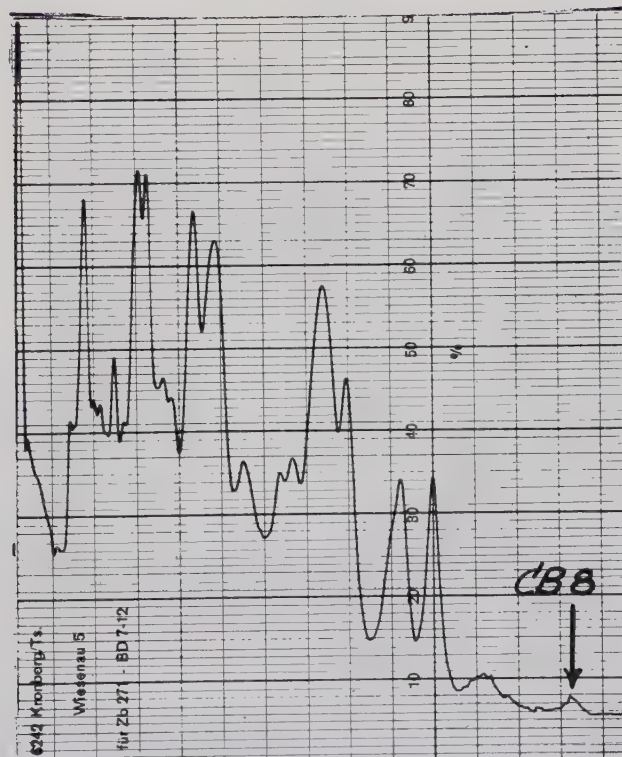
TG	:	13,58 mg
Koll.	:	76,20 %

Probe 8[#] :

Es handelt sich um das Material eines Feten der 24. SSW. mit ausgedehnten z. T. frischen Blutungen im Abdomen sowie im Bereich der Extremitäten und der Haut. Pathomorphologische Veränderungen der Lungen sind nicht nachweisbar.

Bei der Aufarbeitung der Probe zeigt sich ein Trennungverhalten, das einer dem eines jüngeren Gestationsalters entspricht. Der Kollagengehalt des Ausgangsmaterials jedoch ist signifikant höher als der vergleichbarer Proben.

Wie bei jüngeren Feten zeigt der Rückstand R₀ nur eine unvollständige Trennung kollagener und nicht-kollagener Anteile. Auch bei der Cyanogenbromid-Spaltung tritt eine erhebliche Trübung der Kollagenfraktionen auf.



Die Probe wird in 0,5 M Essigsäure 24 h bei 4°C gewaschen

Pepsin-Verdauung :

0,1 mg Pepsin/mg TG in 2 Fraktionen (2 mal 0,05 mg Pepsin/mg TG)
72 h bei 4°C und pH = 2,5 rühren
2 h zentrifugieren (15.000 U/min und 4°C)

Überstand abgießen, Rückstand mit 0,5 M Essigsäure spülen,
2 h zentrifugieren (15.000 U/min und 4°C)
Überstände poolen, auf Kollagen fällen

Rückstand R₀ lyophilisieren (24 h)
TG in mg und Kollagengehalt in % bestimmen

Salzfällung :

gepoolte Überstände (Ü) mindestens 1 Nacht mit 0,9 M NaCl
(52,6 mg NaCl/ml Ü) bei 4°C auf Kollagen fällen

Präzipitat 2 h mit 15.000 U/min und bei 4°C abzentrifugieren

abzentrifugiertes Präzipitat in 0,5 M Essigsäure lösen und 2 Tage gegen 0,1 M Essigsäure dialysieren

dialysierte Proben erneut mit 15.000 U/min und bei 4°C zentrifugieren

klaren Überstand mindestens 24 h lyophilisieren, TG und Kollagengehalt bestimmen

SSW	:	24.
Proben-Nr.	:	8 [#]
Kollagen	:	10,17 %

Pepsin-Verdauung	:	
Einsatz	:	700 mg
Kollagen	:	10,17 %

R ₀ gepoolt	:	
TG	:	203,32 mg
Kollagen	:	4,41 %

Salzfällung	:	
mit	:	0,9 M NaCl
Ü	:	39 ml
NaCl	:	2051,4 mg

2 h zentrifugieren

Dialyse gegen 0,1 M Essigsäure

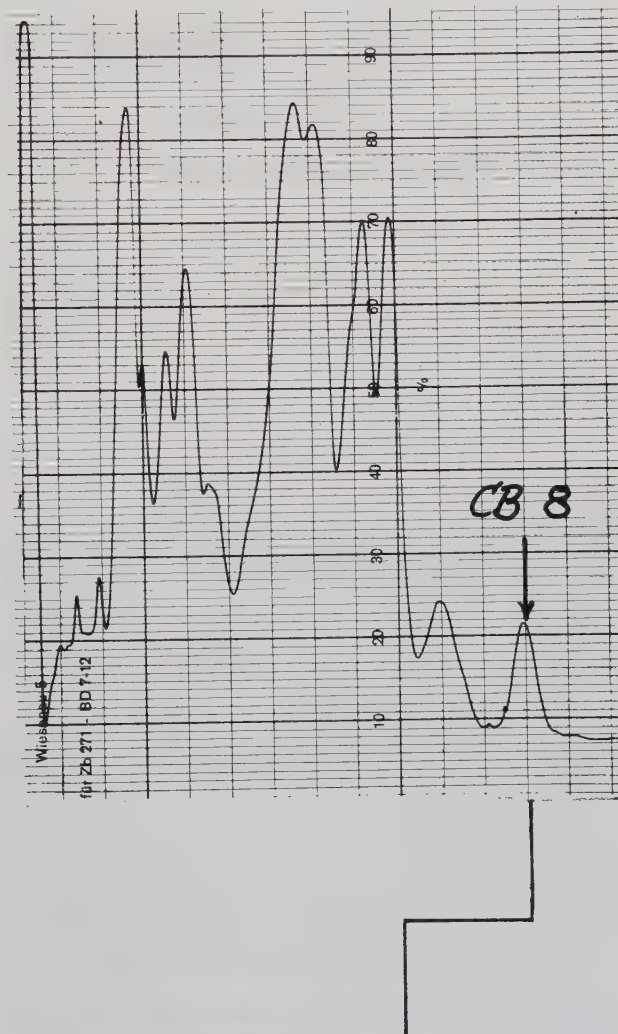
2 h zentrifugieren

TG	:	43,77 mg
Koll.	:	53,79 %

Probe 9[#] :

Es liegt das Lungengewebe des abgestorbenen Zwillings eines Anencephalus aus der 26. Schwangerschaftswoche vor. Dieser Fet weist keine Mißbildungen auf.

Trennungsverhalten, CB-Spaltung, Elektrophorese und Densitometrie zeigen die erwarteten Ergebnisse.



Die Probe wird in 0,5 M Essigsäure gewaschen

Pepsin-Verdauung :

0,1 mg Pepsin/mg TG in 2 Fraktionen (2 mal 0,05 mg Pepsin/mg TG)
72 h bei 4°C und pH = 2,5 rühren
2 h zentrifugieren (1.000 U/min und 4°C)
Überstand abgießen, Rückstand mit 0,5 M Essigsäure spülen,
2 h zentrifugieren (15.000 U/min und 4°C)
Überstände poolen, auf Kollagen fällen

Rückstand R₀ lyophilisieren (24 h)
TG in mg und Kollagengehalt in % bestimmen

Salzfällung :

gepoolte Überstände (Ü) mindestens 1 Nacht mit 0,9 M NaCl
(52,6 mg NaCl/ml Ü) bei 4°C auf Kollagen fällen

Präzipitat 2 h mit 15.000 U/min und bei 4°C zentrifugieren

abzentrifugiertes Präzipitat in 0,5 M Essigsäure lösen und 2 Tage gegen 0,1 M Essigsäure dialysieren

dialysierte Proben erneut mit 15.000 U/min und bei 4°C zentrifugieren

klaren Überstand mindestens 24 h lyophilisieren, TG und Kollagengehalt bestimmen

SSW	:	26.
Proben-Nr.	:	9 [#]
Kollagen	:	7,31 %

Pepsin-Verdauung	:	
Einsatz	:	500 mg
Kollagen	:	7,31 %

R ₀ gepoolt	:	
TG	:	83,16 mg
Kollagen	:	2.47 %

Salzfällung	:	
mit	:	0,9 M NaCl
Ü	:	23 ml
NaCl	:	1209,8 mg

2 h zentrifugieren

Dialyse gegen 0,1 M Essigsäure

2 h zentrifugieren

TG	:	27,36 mg
Koll.	:	87,37 %

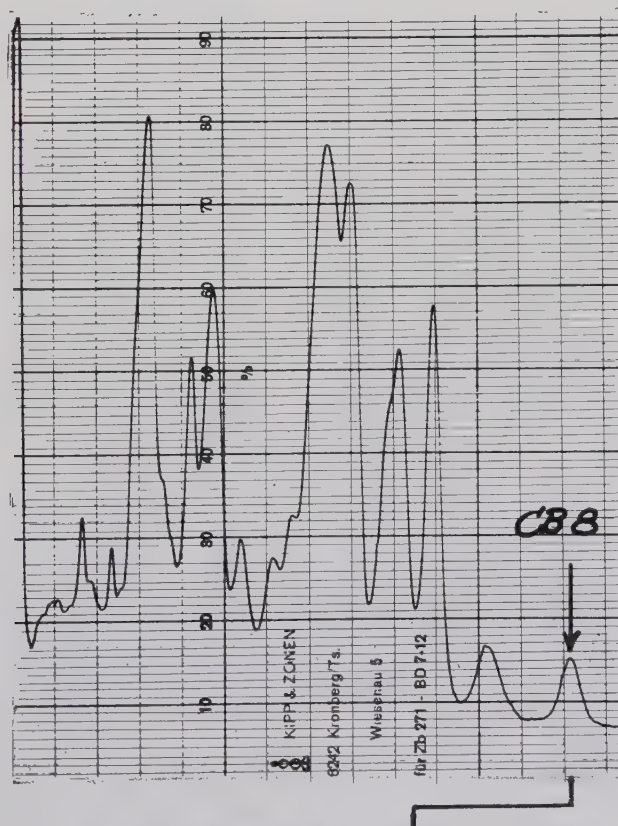
Probe 10[#] :

Bei dieser Probe handelt es sich um einen Fet mit intrauterinem Fruchttod in der 27. Schwangerschaftswoche bei EPH-Gestose. Bei der Sektion findet sich ein Fet in schlechtem Erhaltungszustand mit einem hämorrhagischen Hydrothorax, ausgedehnten Pleuraergüssen beiderseits und einem ausgedehnten Perikarderquß.

Der Kollagengehalt der Ausgangsprobe liegt signifikant über dem der Proben vergleichbaren Gestationsalters.

Es gelingt trotz 2 mal 2-stündigem Zentrifugieren mit 15.000 U/min und bei 4°C nur eine schlechte Trennung des Überstandes von R₀. Erst ein zusätzliches Zentrifugieren des Überstandes über 2 Stunden unter bekannten Bedingungen beseitigt die Schlieren und läßt ein Abgießen des nun klaren Überstandes zu.

Im weiteren Verlauf der Bearbeitung dieser Probe zeigen sich keine Abweichungen mehr.



Die Probe wird in 0,5 M Essigsäure 24 h bei 4°C gewaschen

Pepsin-Verdauung :

0,1 mg Pepsin/mg TG in 2 Fraktionen (2 mal 0,05 mg Pepsin/mg TG)
72 h bei 4°C und pH = 2,5 rühren
2 h zentrifugieren (15.000 U/min und 4°C)

Überstand abgießen, Rückstand mit 0,5 M Essigsäure spülen,
2 h zentrifugieren (15.000 U/min und 4°C)
Überstände poolen, auf Kollagen fällen

Rückstand R₀ lyophilisieren (24 h)
TG in mg und Kollagengehalt in % bestimmen

Salzfällung :

gepoolte Überstände (Ü) mindestens 1 Nacht mit 0,9 M NaCl
(52,6 mg NaCl/ml Ü) bei 4°C auf Kollagen fällen

Präzipitat 2 h mit 15.000 U/min und bei 4°C abzentrifugieren

abzentrifugiertes Präzipitat in 0,5 M Essigsäure lösen und 2 Tage gegen 0,1 M Essigsäure dialysieren

dialysierte Proben erneut mit 15.000 U/min und bei 4°C zentrifugieren

klaren Überstand mindestens 24 h lyophilisieren, TG und Kollagengehalt bestimmen

SSW	:	27.
Proben-Nr.	:	10 [#]
Kollagen	:	10,67 %

Pepsin-Verdauung	:	
Einsatz	:	600 mg
Kollagen	:	10,67 %

R ₀ gepoolt	:	
TG	:	163,73 mg
Kollagen	:	3,70 %

Salzfällung	:	
mit	:	0,9 M NaCl
Ü	:	52 ml
NaCl	:	2735,2 mg

2 h zentrifugieren

Dialyse gegen 0,1 M Essigsäure

2 h zentrifugieren

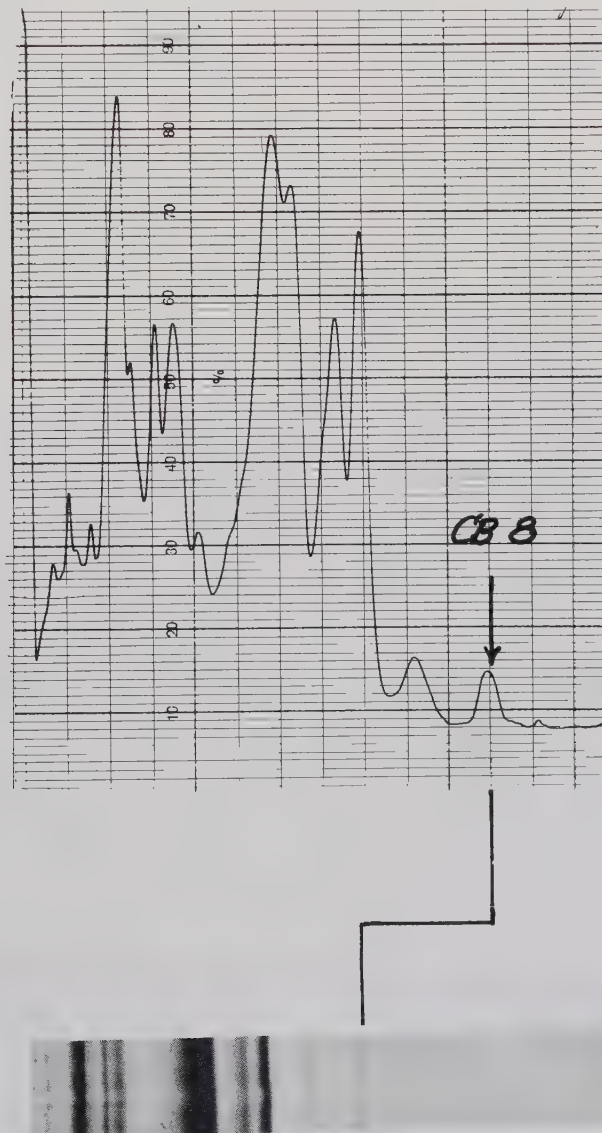
TG	:	43,26 mg
Koll.	:	94,42 %

Probe 11[#] :

Diese Probe aus der 27. Schwangerschaftswoche weist bei Ihrer Bearbeitung keine Auffälligkeiten auf.

Die Kollagenfraktionen 4 - 6 der Cyanogenbromid-Spaltung zeigen jedoch eine leicht Trübung.

Elektrophorese und Densitometrie lassen die charakteristischen Bandenmuster erkennen.



Die Probe wird in 0,5 M Essigsäure 24 h bei 4°C gewaschen

Pepsin-Verdauung :

0,1 mg Pepsin/mg TG in 2 Fraktionen (2 mal 0,05 mg Pepsin/mg TG)
72 h bei 4°C und pH = 2,5 rühren
2 h zentrifugieren (15.000 U/min und 4°C)

Überstand abgießen, Rückstand mit 0,5 M Essigsäure spülen,
2 h zentrifugieren (15.000 U/min und 4°C)
Überstände poolen, auf Kollagen fällen

Rückstand R₀ lyophilisieren (24 h)
TG in mg und Kollagengehalt in % bestimmen

Salzfällung :

gepoolte Überstände (Ü) mindestens 1 Nacht mit 0,9 M NaCl
(52,6 mg NaCl/ml Ü) bei 4°C auf Kollagen fällen

Präzipitat 2 h mit 15.000 U/min und bei 4°C abzentrifugieren

abzentrifugiertes Präzipitat in 0,5 M Essigsäure lösen und 2 Tage gegen 0,1 M Essigsäure dialysieren

dialysierte Proben erneut mit 15.000 U/min und bei 4°C zentrifugieren

klaren Überstand mindestens 24 h lyophilisieren, TG und Kollagengehalt bestimmen

SSW	:	27.
Proben-Nr.	:	11 [#]
Kollagen	:	9,27 %

Pepsin-Verdauung	:	
Einsatz	:	600 mg
Kollagen	:	9,27 %

R ₀ gepoolt	:	
TG	:	182,59 mg
Kollagen	:	4,10 %

Salzfällung	:	
mit	:	0,9 M NaCl
Ü	:	33 ml
NaCl	:	1735,8 mg

2 h zentrifugieren

Dialyse gegen 0,1 M Essigsäure

2 h zentrifugieren

TG	:	34,74 mg
Koll.	:	78,34 %

Probe 12[#] :

Bei dieser Probe liegt das Lungengewebe einer Frühgeburt aus der 27. Schwangerschaftswoche vor, die unter Beatmung 4 Monate gelebt hat. Die Sektion zeigt eine Zytomegalie-Infektion, eine Vena terminalis-Blutung und eine Leberdystrophie. Die Lunge zeigt folgende Befunde :

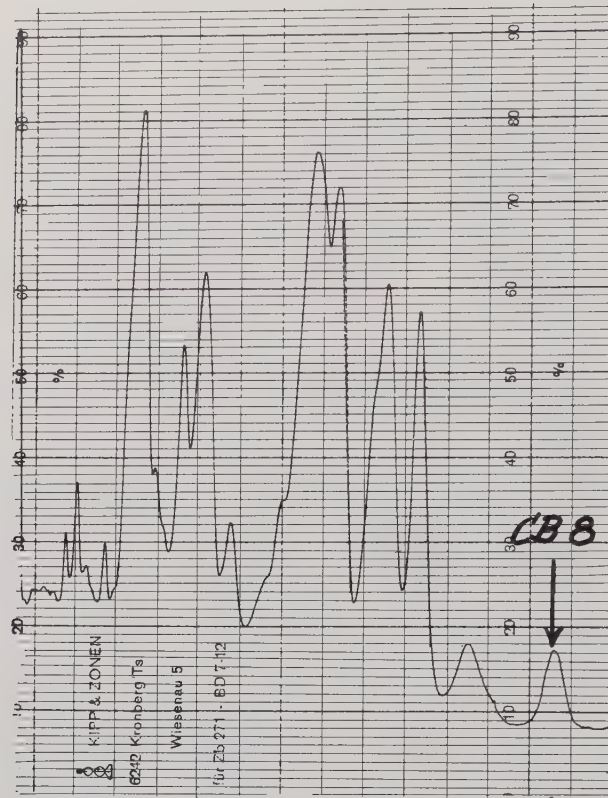
- eine eitrige Tracheobronchitis,
- eine eitrige Bronchiolitis,
- eine konfluierende, stellenweise abszedierende Bronchopneumonie,
- eine interstitielle Fibrose,
- herdförmige Parenchymblutungen und
- eine akute Blutstauung.

Im Trennungsverhalten fallen erhebliche Abweichungen auf. Nach Pepsin-Verdauung und anschließender 2-stündiger Zentrifugation unter bekannten Bedingungen trennt sich der Rückstand R₀ nur unvollständig vom Überstand, der dicke Schlieren aufweist. Deshalb wird auch der Überstand erneut 2 Stunden zentrifugiert. Es wird eine gute Trennung erreicht und der Überstand ist nach dem Abgießen klar.

Die Probe wird entsprechend den Vorschriften weiter verarbeitet. Sie zeigt nun das erwartete Verhalten.

Bei der Reinigung der mit Cyanogenbromid gespaltenen Probe über die Biogel-Säule fällt eine braune Verfärbung der Kollagenfraktionen auf, die bisher noch nicht beobachtet werden konnte, die aber bei der Isolierung der Kollagentypen I und III in den entsprechenden Fraktionen des Typ III-Kollagens zu finden ist.

Elektrophoresemuster und Densitogramm werden im Vergleich mit anderen Proben beurteilt.



Die Probe wird mit 0,5 M Essigsäure 24 h bei 4°C gewaschen

Pepsin-Verdauung :

0,1 mg Pepsin/mg TG in 2 Fraktionen (2 mal 0,05 mg Pepsin/mg TG)
72 h bei 4°C und pH = 2,5 rühren
2 h zentrifugieren (15.000 U/min und 4°C)
Überstand abgießen, Rückstand mit 0,5 M Essigsäure spülen,
2 h zentrifugieren (15.000 U/min und 4°C)
Überstände poolen, auf Kollagen fällen

Rückstand R₀ lyophilisieren (24 h)
TG in mg und Kollagengehalt in % bestimmen

Salzfällung :

gepoolte Überstände (Ü) mindestens 1 Nacht mit 0,9 M NaCl (52,6 mg NaCl/ml Ü) bei 4°C auf Kollagen fällen

Präzipitat 2 h mit 15.000 U/min und bei 4°C abzentrifugieren

abzentrifugiertes Präzipitat in 0,5 M Essigsäure lösen und 2 Tage gegen 0,1 M Essigsäure dialysieren

dialysierte Proben erneut mit 15.000 U/min und bei 4°C zentrifugieren

klaren Überstand mindestens 24 h lyophilisieren, TG und Kollagengehalt bestimmen

SSW	:	27. + 4 Lm
Proben-Nr.	:	12 [#]
Kollagen	:	10,73 %

Pepsin-Verdauung	:	
Einsatz	:	700 mg
Kollagen	:	10,73 %

R ₀ gepoolt	:	
TG	:	160,38 mg
Kollagen	:	3,40 %

Salzfällung	:	
mit	:	0,9 M NaCl
Ü	:	38 ml
NaCl	:	1998,8 mg

2 h zentrifugieren

Dialyse gegen 0,1 M Essigsäure

2 h zentrifugieren

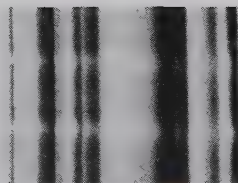
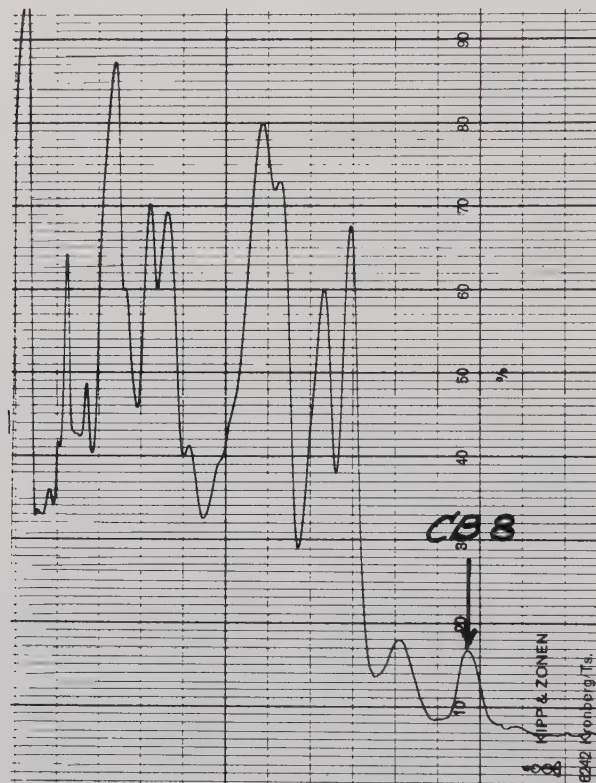
TG	:	51,81 mg
Koll.	:	93,46 %

Probe 13[#] :

Es liegt eine gepoolte Probe aus der 28./29. SSW vor, die keine pathomorphologischen Lungenbefunde bei der Sektion zeigt.

Auch im Analysenverhalten fallen keine Abweichungen auf. Ihre CB-Fractionen 4, 5 und 6 sind klar.

Elektrophorese und Densitogramm zeigen die charakteristischen Muster.



Die Probe wird in 0,5 M Essigsäure 24 h bei 4°C gewaschen

Pepsin-Verdauung :

0,1 mg Pepsin/mg TG in 2 Fraktionen (2 mal 0,05 mg Pepsin/mg TG)
72 h bei 4°C und pH = 2,5 rühren
2 h zentrifugieren (15.000 U/min und 4°C)

Überstand abgießen, Rückstand mit 0,5 M Essigsäure spülen,
2 h zentrifugieren (15.000 U/min und 4°C)

Überstände poolen, auf Kollagen fällen

Rückstand R₀ lyophilisieren (24 h)
TG in mg und Kollagengehalt in % bestimmen

Salzfällung :

gepoolte Überstände (Ü) mindestens 1 Nacht mit 0,9 M NaCl
(52,6 mg NaCl/ml Ü) bei 4°C
auf Kollagen fällen

Präzipitat 2 h mit 15.000 U/min und bei 4°C abzentrifugieren

abzentrifugiertes Präzipitat in 0,5 M Essigsäure lösen und 2 Tage gegen 0,1 M Essigsäure dialysieren

dialysierte Proben erneut mit 15.000 U/min und bei 4°C zentrifugieren

klaren Überstand mindestens 24 h lyophilisieren, TG und Kollagengehalt bestimmen

SSW	:	28. / 29.
Proben-Nr.	:	13 [#]
Kollagen	:	7,13 %

Pepsin-Verdauung	:	
Einsatz	:	500 mg
Kollagen	:	7,13 %

R ₀ gepoolt	:	
TG	:	148,01 mg
Kollagen	:	2,90 %

Salzfällung	:	
mit	:	0,9 M NaCl
Ü	:	30 ml
NaCl	:	1578,0 mg

2 h zentrifugieren

Dialyse gegen 0,1 M Essigsäure

2 h zentrifugieren

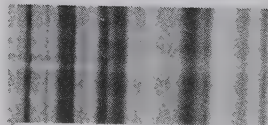
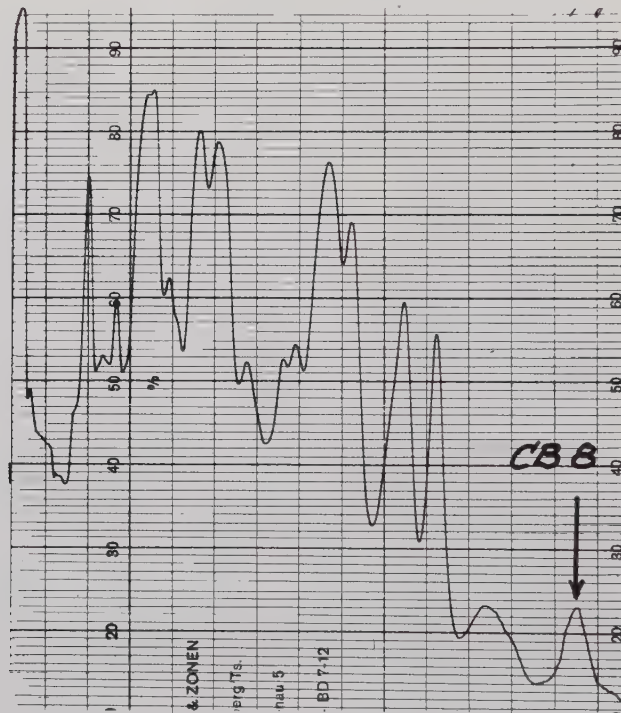
TG	:	26,75 mg
Koll.	:	89,77 %

Probe 14[#] :

Bei der Sektion zeigt diese Frühgeburt aus der 28. SSW ausgeprägte hyaline Membranen und eine Bronchopneumonie.

Auch diese Probe läßt sich nach Pepsin-Verdauung und anschließender Zentrifugation unter bekannten Bedingungen nur unvollständig trennen. Es wird auf ein Abgießen des Überstandes verzichtet und die Probe erneut 2 Stunden zentrifugiert. Nur kann nach dem Abgießen ein klarer Überstand gewonnen werden. Der weitere Verlauf zeigt keine Abweichungen mehr.

Die Kollagenfraktionen der CB-Spaltung sind klar, Elektrophorese und Densitometrie zeigen die charakteristischen Banden.



Die Probe wird in 0,5 M Essigsäure 24 h bei 4°C gewaschen

Pepsin-Verdauung :

0,1 mg Pepsin/mg TG in 2 Fraktionen (2 mal 0,05 mg Pepsin/mg TG)
72 h bei 4°C und pH = 2,5 rühren
2 h zentrifugieren (15.000 U/min und 4°C)
Überstand abgießen, Rückstand mit 0,5 M Essigsäure spülen,
2 h zentrifugieren (15.000 U/min und 4°C)
Überstände poolen, auf Kollagen fällen

Rückstand R₀ lyophilisieren (24 h)
TG in mg und Kollagengehalt in % bestimmen

Salzfällung :

gepoolte Überstände (Ü) mindestens 1 Nacht mit 0,9 M NaCl
(52,6 mg NaCl/ml Ü) bei 4°C auf Kollagen fällen

Präzipitat 2 h mit 15.000U/min und bei 4°C abzentrifugieren

abzentrifugiertes Präzipitat in 0,5 M Essigsäure lösen und 2 Tage gegen 0,1 M Essigsäure dialysieren

dialysierte Proben erneut mit 15.000 U/min und bei 4°C zentrifugieren

klaren Überstand mindestens 24 h lyophilisieren, TG und Kollagengehalt bestimmen

SSW	:	37.
Proben-Nr.	:	14 [#]
Kollagen	:	7,78 %

Pepsin-Verdauung	:	
Einsatz	:	500 mg
Kollagen	:	7,78 %

R ₀ gepoolt	:	
TG	:	166,79 mg
Kollagen	:	6,33 %

Salzfällung	:	
mit	:	0,9 M NaCl
Ü	:	31 ml
NaCl	:	1630,6 mg

2 h zentrifugieren

Dialyse gegen 0,1 M Essigsäure

2 h zentrifugieren

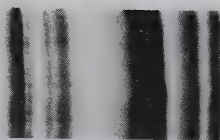
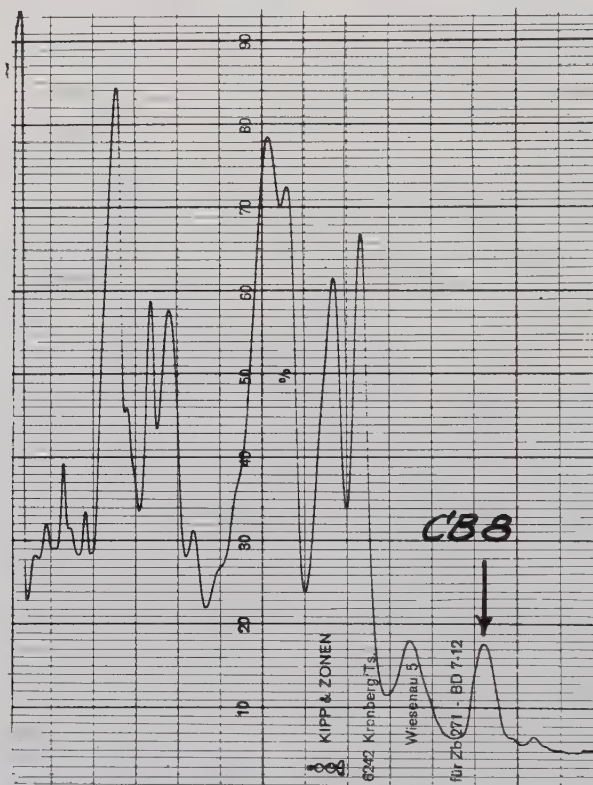
TG	:	29,0 mg
Koll.	:	73,69 %

Probe 15[#] :

Diese termingerecht geborenen Kinder weisen erhebliche Mißbildungen des Herzens auf, die zum Tode geführt haben. Makroskopisch finden sich unauffällige Lungen.

Im Trennungsverhalten zeigt diese gepoolte Probe keine Auffälligkeiten.

Die Fraktionen 4 - 6 der Cyanogenbromid-Spaltung sind klar. Elektrophorese und Densitogramm zeigen die erwarteten Muster.



Die Probe wird in 0,5 M Essigsäure 24 h bei 4°C gewaschen

Pepsin-Verdauung :

0,1 mg Pepsin/mg TG in 2 Fraktionen (2 mal 0,05 mg Pepsin/mg TG)
72 h bei 4°C und pH = 2,5 rühren
2 h zentrifugieren (15.000 U/min und 4°C)
Überstand abgießen, Rückstand mit 0,5 M Essigsäure spülen,
2 h zentrifugieren (15.000 U/min und 4°C)
Überstände poolen, auf Kollagen fällen

Rückstand R₀ lyophilisieren (24 h)
TG in mg und Kollagengehalt in % bestimmen

Salzfällung :

gepoolte Überstände (Ü) mindestens 1 Nacht mit 0,9 M NaCl
(52,6 mg NaCl/ml Ü) bei 4°C auf Kollagen fällen

Präzipitat 2 h mit 15.000 U/min und bei 4°C abzentrifugieren

abzentrifugiertes Präzipitat in 0,5 M Essigsäure lösen und 2 Tage gegen 0,1 M Essigsäure dialysieren

dialysierte Proben erneut mit 15.000 U/min und bei 4°C zentrifugieren

klaren Überstand mindestens 24 h lyophilisieren, TG und Kollagengehalt bestimmen

SSW	:	Termin
Proben-Nr.	:	15 [#]
Kollagen	:	8,79 %

Pepsin-Verdauung	:	
Einsatz	:	500 mg
Kollagen	:	8,79 %

R ₀ gepoolt	:	
TG	:	151,37 mg
Kollagen	:	3,51 %

Salzfällung	:	
mit	:	0,9 M NaCl
Ü	:	35 ml
NaCl	:	1841,0 mg

2 h zentrifugieren

Dialyse gegen 0,1 M Essigsäure

2 h zentrifugieren

TG	:	32,45 mg
Koll.	:	84,77 %

Probe 16[#] :

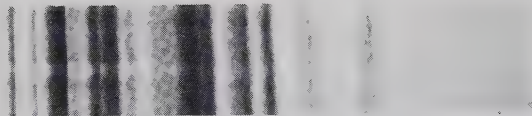
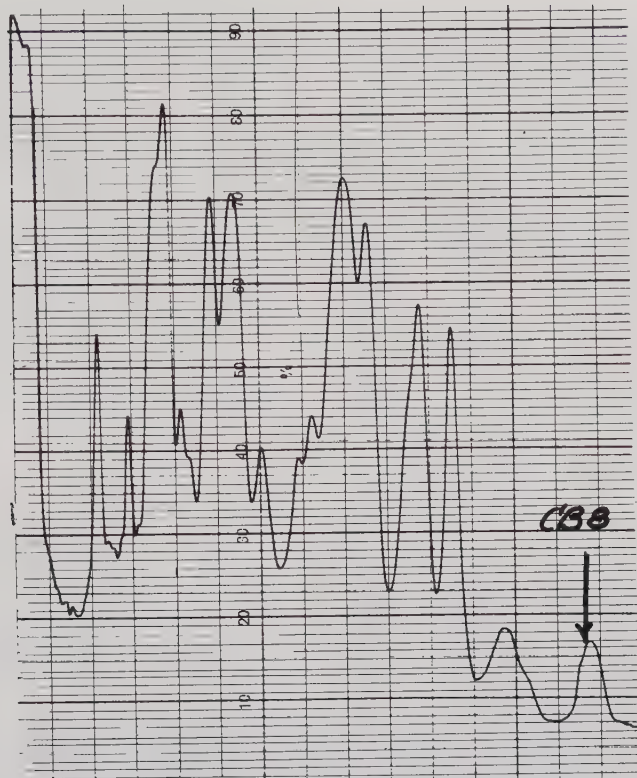
Es handelt sich um das Lungengewebe eines jungen Säuglings im 2. Lebensmonat. Der Sektionsbefund zeigt :

- makroskopisch : - herdförmige Lungenparenchymblutungen,
 - ausgedehnte Atelektasen beiderseits,
 - multiple subpleurale Petechien beiderseits,
 - eine frische Aspiration und
- mikroskopisch : - eine hochgradige Blutstauung,
 - ein geringes Lungenödem,
 - kleine Parenchymblutungen zusätzlich zu
 den oben genannten Befunden.

Trotz des erheblichen Lungenbefundes verläuft die Trennung erwartungsgemäß.

CB-Fractionen zeigen keine Trübungen, Elektrophorese und Densitometrie sind unauffällig.

Wegen der großen Menge des zur Verfügung stehenden Materials wird diese Probe auch zur Isolierung der Kollagentypen I und III mit getrennter Darstellung verwendet.



Die Probe wird in 0,5 M Essigsäure 24 h bei 4°C gewaschen

Pepsin-Verdauung :

0,1 mg Pepsin/mg TG in 2 Fraktionen (2 mal 0,05 mg Pepsin/mg TG)
72 h bei 4°C und pH = 2,5 rühren
2 h zentrifugieren (15.000 U/min und 4°C)
Überstand abgießen, Rückstand mit 0,5 M Essigsäure spülen,
2 h zentrifugieren (15.000 U/min und 4°C)
Überstände poolen, auf Kollagen fällen

Rückstand R₀ lyophilisieren (24 h)
TG in mg und Kollagengehalt in % bestimmen

Salzfällung :

gepoolte Überstände (Ü) mindestens 1 Nacht mit 0,9 M NaCl
(52,6 mg NaCl/ml Ü) bei 4°C auf Kollagen fällen

Präzipitat 2 h mit 15.000 U/min und bei 4°C abzentrifugieren

abzentrifugiertes Präzipitat in 0,5 M Essigsäure lösen und 2 Tage gegen 0,1 M Essigsäure dialysieren

dialysierte Proben erneut mit 15.000 U/min und bei 4°C zentrifugieren

klaren Überstand mindestens 24 h lyophilisieren, TG und Kollagengehalt bestimmen

Alter	:	2. Im.
Proben-Nr.	:	16 [#]
Kollagen	:	10,16 %

Pepsin-Verdauung	:	
Einsatz	:	500 mg
Kollagen	:	10,16 %

R ₀ gepoolt	:	
TG	:	113,49 mg
Kollagen	:	3,97 %

Salzfällung	:	
mit	:	0,9 M NaCl
Ü	:	24 ml
NaCl	:	1262,4 mg

2 h zentrifugieren

Dialyse gegen 0,1 M Essigsäure

2 h zentrifugieren

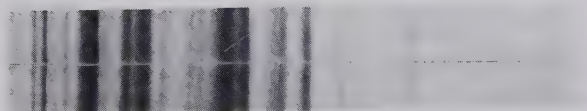
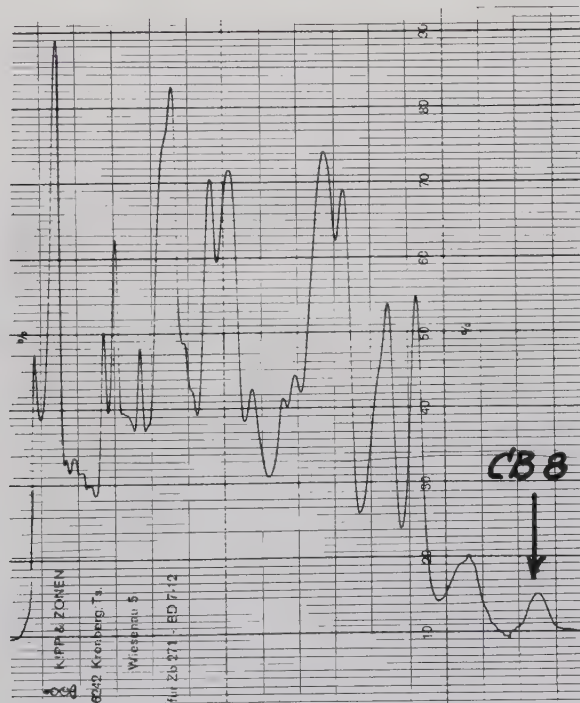
TG	:	36,22 mg
Koll.	:	93,25 %

Probe 17[#] :

Es liegt das Gewebe eines 4 Monate alten Säuglings mit einer Trisomie 21 vor. Das Herz zeigt ein Vitium, die Lungen sind unauffällig.

Das Ausgangsmaterial zeigt ein sehr hohes Kollagen. Die Aufarbeitung der Probe läßt eine unvollständige Trennung des Überstandes vom Rückstand R₀ nach der Zentrifugation erkennen. Deshalb wird der Überstand erneut 2 h zentrifugiert. Dicke Schlieren setzen sich ab. Die weitere Verarbeitung des nun klaren Überstandes verläuft erwartungsgemäß.

Bei der Reinigung der Proben nach CB-Spaltung kann in den Fraktionen 4 und 5 eine braune Verfärbung beobachtet werden, die bei Typ III-Kollagen in den entsprechenden Fraktionen nach Isolierung der Kollagentypen auftritt. Fraktion 6 ist klar und nicht verfärbt.



Die Probe wird in 0,5 M Essigsäure 24 h bei 4°C gewaschen

Pepsin-Verdauung :

0,1 mg Pepsin/mg TG in 2 Fraktionen (2 mal 0,05 mg Pepsin/mg TG) 72 h bei 4°C und pH = 2,5 rühren 2 h zentrifugieren (15.000 U/min und 4°C)

Überstand abgießen, Rückstand mit 0,5 M Essigsäure spülen, 2 h zentrifugieren (15.000 U/min und 4°C) Überstände poolen, auf Kollagen fällen

Rückstand R₀ lyophilisieren (24 h) TG in mg und Kollagengehalt in % bestimmen

Salzfällung :

gepoolte Überstände (Ü) mindestens 1 Nacht mit 0,9 M NaCl (52,6 mg NaCl/ml Ü) bei 4°C auf Kollagen fällen

Präzipitat 2 h mit 15.000 U/min und bei 4°C abzentrifugieren

abzentrifugiertes Präzipitat in 0,5 M Essigsäure lösen und 2 Tage gegen 0,1 M Essigsäure dialysieren

dialysierte Proben erneut mit 15.000 U/min und bei 4°C zentrifugieren

klaren Überstand mindestens 24 h lyophilisieren, TG und Kollagengehalt bestimmen

Alter	:	4. Im
Proben-Nr.	:	17 [#]
Kollagen	:	18,85 %

Pepsin-Verdauung	:	
Einsatz	:	470 mg
Kollagen	:	18,85 %

R ₀ gepoolt	:	
TG	:	104,15 mg
Kollagen	:	4,67 %

Salzfällung	:	
mit	:	0,9 M NaCl
Ü	:	19 ml
NaCl	:	999,4 mg

2 h zentrifugieren

Dialyse gegen 0,1 M Essigsäure

2 h zentrifugieren

TG	:	29,70 mg
Koll.	:	93,08 %

4.3. Das Verhalten der Proben nach Kollagenanreicherung
und Isolierung der Kollagentypen I und III

Für die Isolierung der Kollagentypen I und III sind wesentlich größere Mengen des getrockneten Ausgangsmaterials erforderlich als zur Bestimmung der Menge des Gesamtkollagens.

Deshalb ist es nur möglich, Proben des älteren Gestationsalters einzusetzen, die das notwendige Trockengewicht von wenigstens 1000 mg erreichen. Im anderen Fall müssen zu viele Proben gepoolt werden und die zu erwartenden Ergebnisse wären zu ungenau. Aus dem gleichen Grund werden Gewebe mit pathomorphologischem Befund getrennt berücksichtigt.

Tabelle 19 zeigt die in dieser Gruppe verwendeten Proben in Abhängigkeit ihres Gestationsalters.

Nr. :	Proben-Nr.	SSW	Kollagen in % Einzelpr.	Kollagen in % gepoolte Pr.
1*	22	25	5,40	
2*	24	26	15,02	13,13
	25	26	12,49	
3*	26	26	11,80	
4*	32	29	6,07	6,02
	35	32	6,44	
5*	36	37	8,21	
6*	37	37	6,14	

Nr. :	Proben-Nr.	SSW	Kollagen in % Einzelpr.	Kollagen in % gepoolte Pr.
7*	39	40	8,66	
8*	42	Termin	11,33	
9*	43	2. Im.	10,16	
10*	44	3. Im + 3 Wo.	7,13	

Tab. 19 Übersicht über die zur Isolierung der Kollagenty-
pen I und III eingesetzten Proben, ihren Kollagen-
gehalt sowie Zusammenstellung der gepoolten Proben.

Im folgenden werden die Proben einzeln besprochen.

Probe 1* :

Diese Probe hat bei der Isolierung der Kollagentyphen I und III der fetalen Haut (76) in der Elektrophorese ein verändertes Bandenmuster gezeigt. Deshalb wird dieses Gewebe als Einzelprobe verwendet, obwohl der Kollagengehalt des Ausgangsmaterials dem Gestationsalter entsprach und keine erkennbaren pathomorphologischen Veränderungen nachweisbar sind.

Auch bei der Verwendung von Lungengewebe weicht diese Probe vom erwarteten Trennungsverhalten ab.

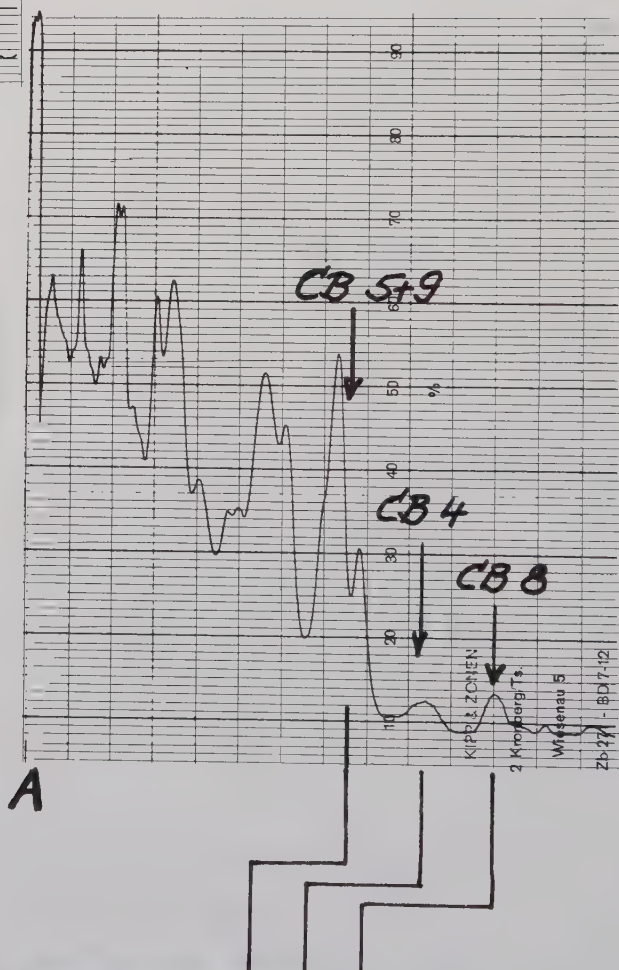
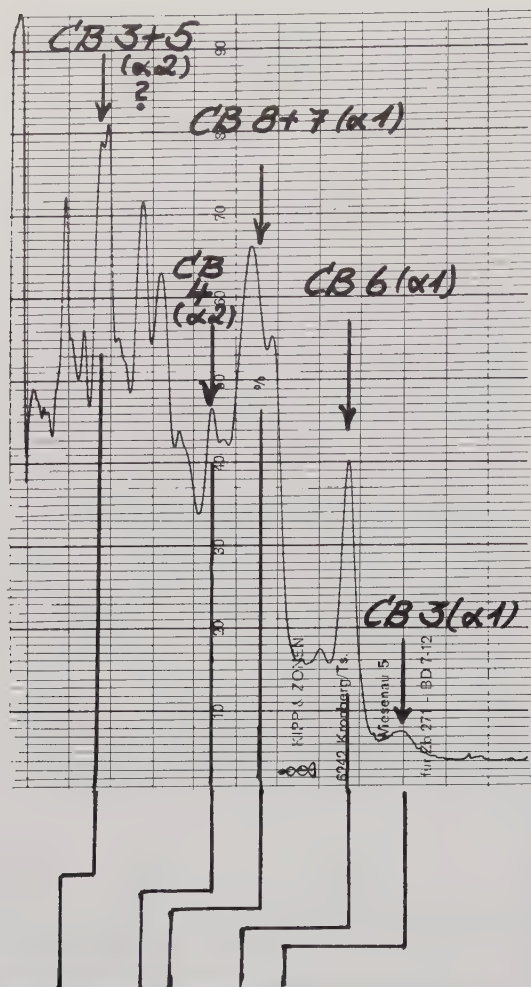
Nach Pepsin-Verdauung und anschließender Zentrifugation unter bekannten Bedingungen läßt sich der Rückstand R₀ gut vom klaren Überstand trennen. R₀ ist jedoch sehr flüssig und läuft nach dem Abgießen des Überstandes mit nach unten. Er zeigt gelatineartige Konsistenz.

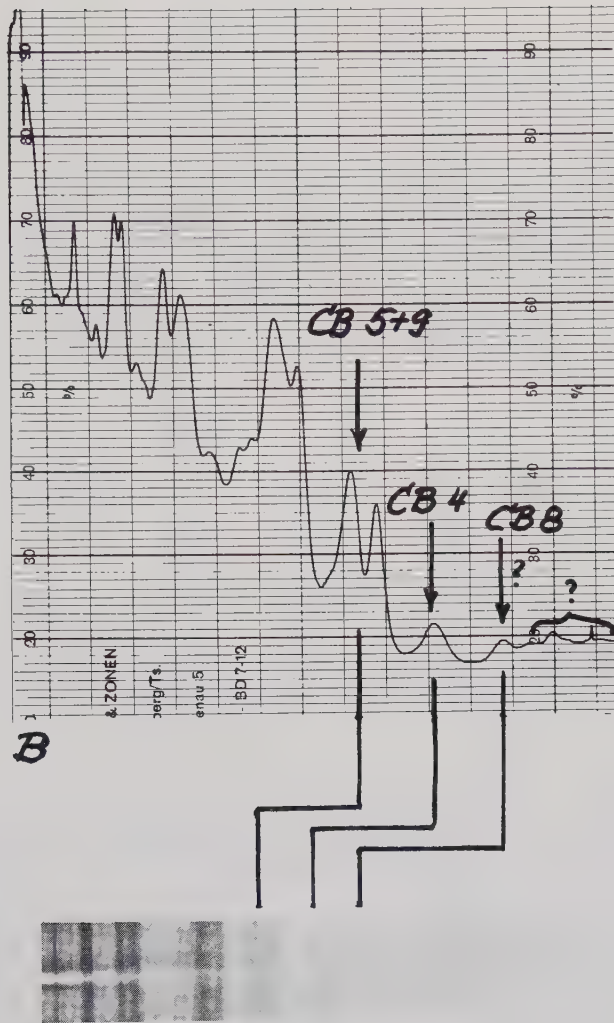
Im weiteren Verlauf der Analyse (nach 1. Salzfällung, Dialyse gegen 0,05 M Tris-HCl/1 M NaCl und 2 stündiger Zentrifugation unter bekannten Bedingungen) wird ein sehr flüssiger Rückstand R_1 abgesetzt, der beim Abgießen des klaren Überstandes mitläuft, so daß eine Verunreinigung des Überstandes mit R_1 nur mit Mühe verhindert werden kann. Zur Sicherheit werden beide Kompartimente weiter bearbeitet. Es folgen 3. Salzfällung auf 5 M NaCl, erneute Zentrifugation (15.000 U/min, 4°C), ausgiebige Dialyse gegen destilliertes Wasser und Lyophilisieren über 24 Stunden.

Anschließend werden die Produkte beider Teile der Cyanogenbromid-Spaltung zugeführt. Dabei zeigt Fraktion 4 des Typ I-Kollagens eine leichte Braunfärbung, Typ III des Kompartimentes A zeigt in den Fraktionen 4 und 5 eine leichte Trübung sowie in allen Fraktionen (4 - 6) eine braune Verfärbung.

Typ III-Kollagen des Ansatzes B läßt lediglich eine braune Verfärbung in den Teilen 4 und 5 bei fehlender Trübung der Kollagenfraktionen erkennen.

Alle gewonnenen Proben werden nach der CB-Spaltung in Elektrophorese und Densitometrie eingesetzt.





A

Probe wird in 0,5 M Essigsäure
24 h bei 4°C gewaschen

Pepsin-Verdauung :

0,1 mg Pepsin/mg TG in 2 Fraktionen,
72 h bei 4°C und pH = 2,5
2 h zentr. (15.000 U/min, 4°C),
Rückstand R₀ in 0,5 M Essigsäure
spülen, 2 h zentr., Überstände
poolen und auf Kollagen fällen

Salzfällung :

gepoolte Überstände (Ü) über
Nacht mit 0,9 M NaCl (52,6 mg
NaCl/ml Ü) bei 4°C auf Kollagen
fällen

Präzipitat 2 h zentr.

apzentr. Präzipitat lösen in u.
dialysieren gegen 0,05 M Tris-
HCl/1 M NaCl (pH=7,5) bei 4°C

Dialysat 2 h zentr.

Überstand gegen 0,5 M Essigsäure
bei 4°C dialysieren
Rückstand R₁ lösen in und dialy-
sieren gegen 0,5 M Essigsäure

beide Fraktionen lyophilisieren

Salzfällung :

Lyophilisat von Ü in 0,05 M
Tris-HCl/1 M NaCl-Puffer
lösen (pH = 7,5 , 1 ml/mg Lyo.)

Präzipitat 2 h zentr.

Schritte zur Iso-
lierung v. Typ I

Ü über Nacht auf 5 M
NaCl (+ 4 M NaCl)
fällen

2 h zentrifugieren

Präzipitat lösen in
0,5 M Essigsäure u.
Dial. g. H₂O^{dest.}

24 h lyophilisieren

3. Salzfällung
mit 5 M NaCl
Ü : 24 ml
NaCl: 5,61 g

2 h zentr.

Dialyse g. H₂O

24 h lyophil.

Koll. Typ I
TG : 5,70 mg
Koll: 94,12 %

SSW : 25.
Proben-Nr. 1*
Kollagen : 5,40 %

Pepsin-Verdauung :
Einsatz : 1300 mg
Kollagen: 5,40 %

1. Salzfällung :
mit 0,9 M NaCl
Ü : 34 ml
NaCl: 1788,4 mg

2 h zentrifugieren

Dialyse gegen 0,05 M
Tris-HCl/1 M NaCl

2 h zentrifugieren

Dialyse gegen 0,5 M
Essigsäure

24 h lyophilis.

Überstand :
TG : 23,81 mg
Koll. 57,6 %

2. Salzfällung :
Einsatz : 22,96 mg
Kollagen: 57,6 %

2 h zentrifugieren

R₀ gepoolt :
TG : 418,59 mg
Koll. 4,60 %

R₁ (s. unter B) :
TG : 22,31 mg
Koll. 51,07 %

Schritte zur Iso-
lierung v. Typ III

Rückstand R₂ lösen in
0,5 M Essigsäure u.
Dial. g. H₂O^{dest.}

24 h lyophilisieren

Koll. Typ III
TG : 8,71 mg
Koll: 72,96 %

B

Probe wird in 0,5 M Essigsäure
24 h bei 4°C gewaschen

Pepsin-Verdauung :

0,1 mg Pepsin/mg TG in 2 Fraktionen,
72 h bei 4°C und pH = 2,5
2 h zentr. (15.000 U/min, 4°C)
Rückstand R₀ in 0,5 M Essigsäure
spülen, 2 h zentr., Überstände
poolen und auf Kollagen fällen

Salzfällung :

gepoolte Überstände (Ü) über
Nacht mit 0,9 M NaCl (52,6 mg
NaCl/ml Ü) bei 4°C auf Kollagen
fällen

Präzipitat 2 h zentr.

abzentr. Präzipitat lösen in u.
dialysieren gegen 0,05 M Tris-
HCl/1 M NaCl (pH=7,5) bei 4°C

Dialysat 2 h zentr.

Überstand gegen 0,5 M Essigsäure
bei 4°C dialysieren
Rückstand R₁ lösen in und dialy-
sieren gegen 0,5 M Essigsäure

beide Fraktionen lyophilisieren

Salzfällung :

Lyophilisat von R₁ in 0,05 M
Tris-HCl/1 M NaCl-Puffer lösen
(pH = 7,5 , 1 ml P./mg Lyo.)

Präzipitat 2 h zentr.

Schritte zur Iso-
lierung v. Typ I

Ü über Nacht auf 5 M
NaCl (+ 4 M NaCl)
fällen

2 h zentrifugieren

Präzipitat lösen in
0,5 M Essigsäure u.
Dial. g. H₂O_{dest}

24 h lyophilisieren

SSW	: 25.
Proben-Nr.	1*
Kollagen	: 5,40 %

Pepsin-Verdauung :	
Einsatz	1300 mg
Kollagen	: 5,40 %

R ₀ gepoolt	:
TG	: 418,59 mg
Koll.	: 4,60 %

1. Salzfällung :	
mit 0,9 M NaCl	
Ü	: 34 ml
NaCl	: 1788,4 mg

2 h zentrifugieren

Dialyse gegen 0,05 M
Tris-HCl/1 M NaCl

2 h zentrifugieren

Dialyse gegen 0,5 M
Essigsäure

24 h lyophilis.

R ₁	:
TG	: 22,31 mg
Koll.	: 51,07 %

Ü (s. unter A)	:
TG	: 23,81 mg
Koll.	: 57,6 %

2. Salzfällung :	
Einsatz	: 21,38 mg
Kollagen	: 51,07 %

2 h zentrifugieren

Schritte zur Iso-
lierung v. Typ III

3. Salzfällung	
mit 5 M NaCl	
Ü	: 21 ml
NaCl	: 4,9 g

2 h zentr.

Dialyse g. H₂O

24 h lyophil.

Koll. Typ I	
TG	: 0,83 mg
Koll.	: 53,93 %

Dialyse g. H₂O

24 h lyophil.

Koll. Typ III	
TG	: 10,01 mg
Koll.	: 59,46 %

Rückstand R₂ lösen in
0,5 M Essigsäure u.
Dial. g. H₂O_{dest}

Probe 2* :

Hier handelt es sich um die gepoolte Probe von 2 Anencephali aus der nach klinischen Angaben 26. Schwangerschaftswoche.

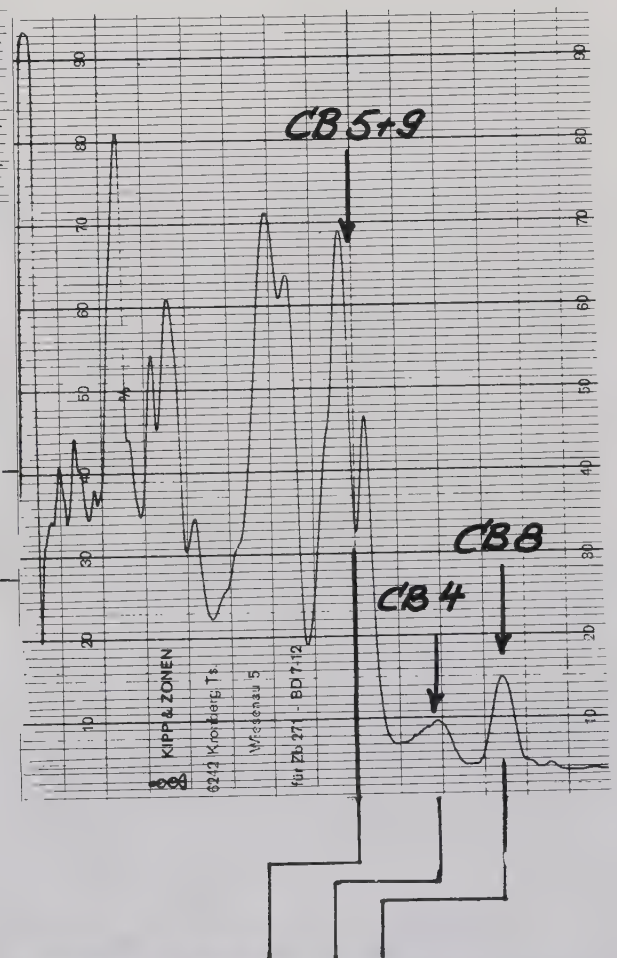
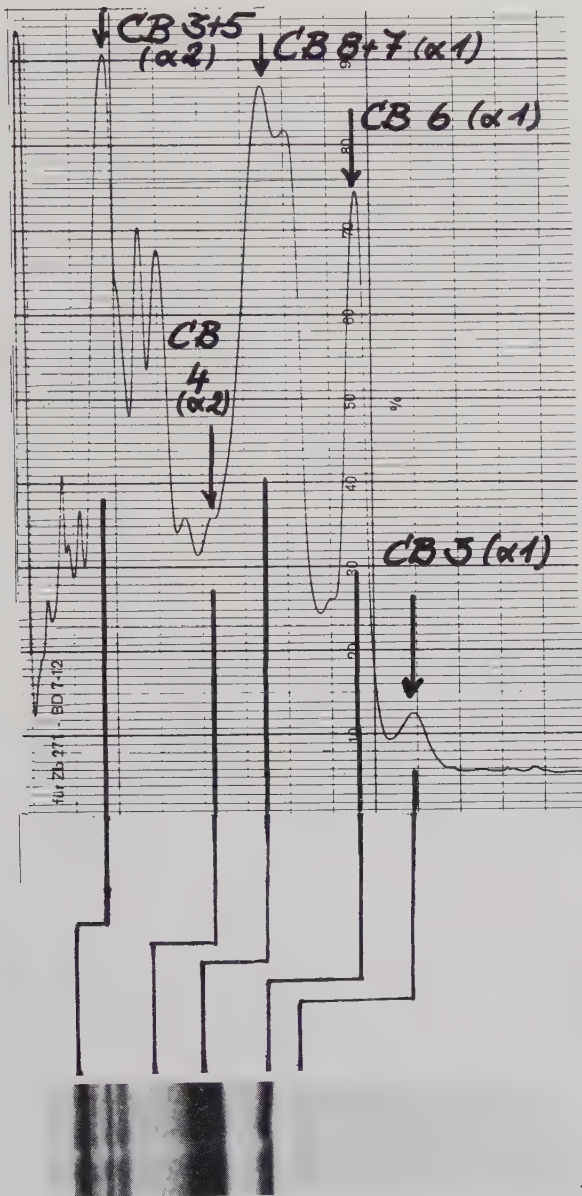
(Genauere, anhand der Scheitel-Fersen-Länge angegliche Daten zum wahrscheinlichen Gestationsalter sind wegen des fehlenden Hirnschädels nur schwer zu erhalten und sehr ungenau.)

Auch bei dieser Gewebeprobe treten Abweichungen im Analysengang auf. So läuft der Rückstand R_0 in dicken Schlieren nach Pepsin-Verdauung und 2 mal 2 stündiger Zentrifugation beim Abgießen des Überstandes mit. Auch nach erneuter Zentrifugation mit 15.000U/min und bei 4°C kann keine vollständige Trennung zwischen dem sonst klaren Überstand und dem Rückstand R_0 erreicht werden.

Die weitere Aufarbeitung der Probe (1. Salzfällung, Dialyse gegen 0,05 M Tris-HCl/1 M NaCl und 2 h Zentrifugation unter bekannten Bedingungen) zeigt eine gute Trennung des Rückstandes R_1 vom Überstand. Beim Abgießen des Überstandes läuft R_1 jedoch wieder mit. Diesmal kann eine Verunreinigung des anderen Kompartimentes vermieden werden.

Der weitere Ablauf zur Extraktion der Kollagentypen I und III zeigt keine weiteren Auffälligkeiten.

Die Cyanogenbromid-Spaltung der beiden Bestandteile läßt eine erhebliche Braunfärbung der Fraktionen 4 und 5 des Kollagentypes III erkennen, während die entsprechenden CB-Fraktionen des Types I klar sind.



Probe wird in 0,5 M Essigsäure
24 h bei 4°C gewaschen

Pepsin-Verdauung :

0,1 mg Pepsin/mg TG in 2 Fraktio-
nen, 72 h bei 4°C und pH = 2,5
2 h zentr. (15.000 U/min, 4°C)
Rückstand R₀ in 0,5 M Essigsäure
spülen, 2 h zentr., Überstände
poolen und auf Kollagen fällen

Salzfällung :

gepoolte Überstände (Ü) über
Nacht mit 0,9 M NaCl (52,6 mg
NaCl/ml Ü) bei 4°C auf Kollagen
fällen

Präzipitat 2 h zentr.

abzentr. Präzipitat lösen in u.
dialysieren gegen 0,05 M Tris-
HCl/1 M NaCl (pH=7,5) bei 4°C

Dialysat 2 h zentr.

Überstand gegen 0,5 M Essigsäure
bei 4°C dialysieren

Rückstand R₁ lösen in und dialy-
sieren gegen 0,5 M Essigsäure

beide Fraktionen lyophilisieren

Salzfällung :

Lyophilisat von Ü in 0,05 M
Tris-HCl/1 M NaCl-Puffer lösen
(pH = 7,5 , 1 ml P./mg Lyo.)

Präzipitat 2 h zentr.

Schritte zur Iso- lierung v. Typ I

Ü über Nacht auf 5 M
NaCl (+ 4 M NaCl)
fällen

2 h zentrifugieren

Präzipitat lösen in
0,5 M Essigsäure u.
Dial. g. H₂O_{dest}

24 h lyophilisieren

3. Salzfällung
mit 5 M NaCl
Ü : 70,5 ml
NaCl:16,48 g

2 h zentr.

Dialyse g. H₂O

24 h lyophil.

Koll. Typ I
TG : 32,68 mg
Koll. 99,39 %

SSW : 26.
Proben-Nr. 2*
Kollagen : 13,13 %

Pepsin-Verdauung :
Einsatz : 1000 mg
Kollagen: 13,13 %

1. Salzfällung :
mit 0,9 M NaCl
Ü : 42 ml
NaCl: 2209,2 mg

2 h zentrifugieren

Dialyse gegen 0,05 M
Tris-HCl/1 M NaCl

2 h zentrifugieren

Dialyse gegen 0,5 M
Essigsäure

24 h lyophilis.

Überstand :
TG : 74,23 mg
Koll. 80,90 %

2. Salzfällung :
Einsatz ; 73,52 mg
Kollagen: 80,90 %

2 h zentrifugieren

R₀ gepoolt :
TG : 257,93 mg
Koll. 4,60 %

R₁ :
TG : 6,42 mg
Koll. 53,62 %

Schritte zur Iso- lierung v. Typ III

Rückstand R₂ lösen in
0,5 M Essigsäure u.
Dial. g. H₂O_{dest}

24 h lyophilisieren

Koll. Typ III
TG ; 28,20 mg
Koll.101,71 %

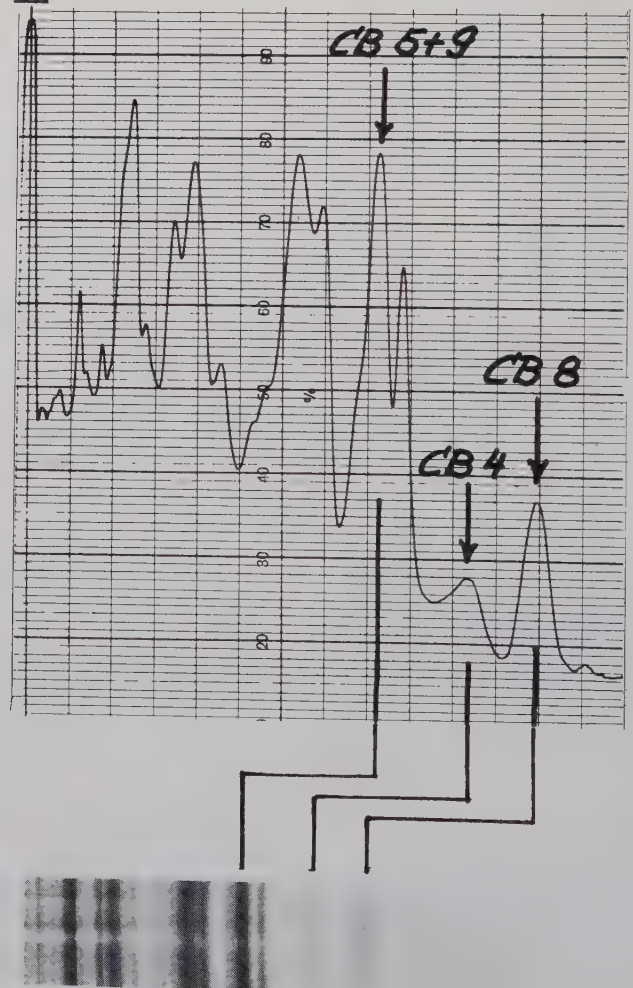
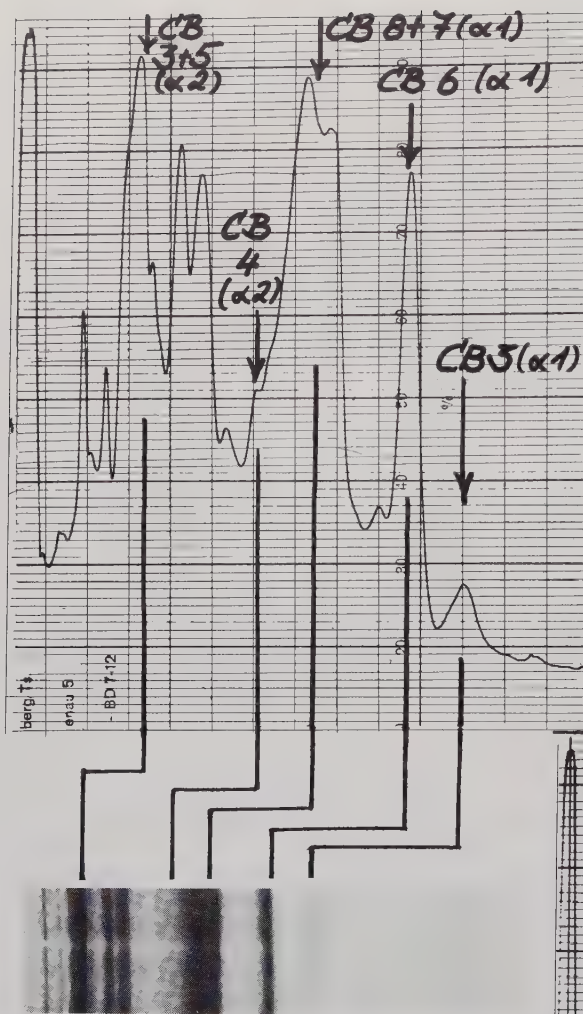
Probe 3* :

Dieser Fet der 26. SSW mit Blutungen bei Placenta praevia und vorzeitigem Blasensprung zeigt bei der Sektion eine extreme Blutstauung der inneren Organe mit evtl. iatrogen entstandener hämorrhagischer Pleuraergußbildung.

Der Kollagengehalt der Ausgangsprobe liegt mit 11,80 % über den Werten vergleichbarer Schwangerschaftswochen.

Das Extraktionsverhalten zeigt dagegen außer einer schlechten Lösbarkeit des Lyophilisates des Überstandes in 0,05 M Tris-HCl/1 M NaCl (nach 1. Salzfällung, Zentrifugation, Dialyse gegen 0,05 M Tris-HCl/1 M NaCl, Zentrifugation, Dialyse gegen 0,5 M Essigsäure und anschließendem Lyophilisieren) keine Abweichungen vom erwarteten Trennungsverhalten. Die nach 5 Tagen noch ungelösten, festen Bestandteile werden durch Zentrifugation mit 15.000 U/min und bei 4°C aus dem nun klaren Überstand entfernt.

Auch hier zeigen die Fraktionen 4 - 6 der CB-Spaltung beim Kollagentyp III eine braune Verfärbung, während die entsprechenden Fraktionen beim Typ I-Kollagen klar sind.



Probe wird in 0,5 M Essigsäure
24 h bei 4°C gewaschen

Pepsin-Verdauung :

0,1 mg Pepsin/mg TG in 2 Fraktionen,
72 h bei 4°C und pH = 2,5
2 h zentr. (15.000 U/min, 4°C)
Rückstand R₀ in 0,5 M Essigsäure
spülen, 2 h zentr., Überstände
poolen und auf Kollagen fällen

Salzfällung :

gepoolte Überstände (Ü) über
Nacht mit 0,9 M NaCl (52,6 mg
NaCl/ml Ü) bei 4°C auf Kollagen
fällen

Präzipitat 2 h zentr.

abzentr. Präzipitat lösen in u.
dialysieren gegen 0,05 M Tris-
HCl/1 M NaCl (pH=7,5) bei 4°C

Dialysat 2 h zentr.

Überstand gegen 0,5 M Essigsäure
bei 4°C dialysieren
Rückstand R₁ lösen in und dialy-
sieren gegen 0,5 M Essigsäure

beide Fraktionen lyophilisieren

Salzfällung :

Lyophilisat von Ü in 0,05 M
Tris-HCl/1 M NaCl-Puffer lösen
(pH = 7,5 . 1 ml P./mg Lyo.)

Präzipitat 2 h zentr.

Schritte zur Iso-
lierung von Typ I

Ü über Nacht auf 5 M
NaCl (+ 5 M NaCl)
fällen

2 h zentrifugieren

Präzipitat lösen in
0,5 M Essigsäure u.
Dial. g. H₂O_{dest}

24 h lyophilisieren

3. Salzfällung
mit 5 M NaCl
Ü : 51 ml
NaCl: 11,92 g

2 h zentr.

Dialyse g. H₂O

24 h lyophil.

Koll. Typ I
TG : 19,54 mg
Koll. 86,08 %

SSW : 26.
Proben-Nr. 3*
Kollagen : 11,8 %

Pepsin-Verdauung :
Einsatz : 1200 mg
Kollagen: 11,80 %

1. Salzfällung :
mit 0,9 M NaCl
Ü : 73 ml
NaCl: 3839,8 mg

2 h zentrifugieren

Dialyse gegen 0,05 M
Tris-HCl/1 M NaCl

2 h zentrifugieren

Dialyse gegen 0,5 M
Essigsäure

24 h lyophilis.

Überstand :
TG : 53,98 mg
Koll. 80,18 %

2. Salzfällung :
Einsatz : 52,66 mg
Kollagen: 80,18 %

2 h zentrifugieren

R₀ gepoolt :
TG : 327,46 mg
Koll. 3,07 %

R₁ :
TG : 1,70 mg
Koll. 30,11 %

Schritte zur Iso-
lierung von Typ III

Rückstand R₂ lösen in
0,5 M Essigsäure u.
Dial. g. H₂O_{dest}

24 h lyophilisieren

Koll. Typ III
TG : 21,85 mg
Koll. 74,91 %

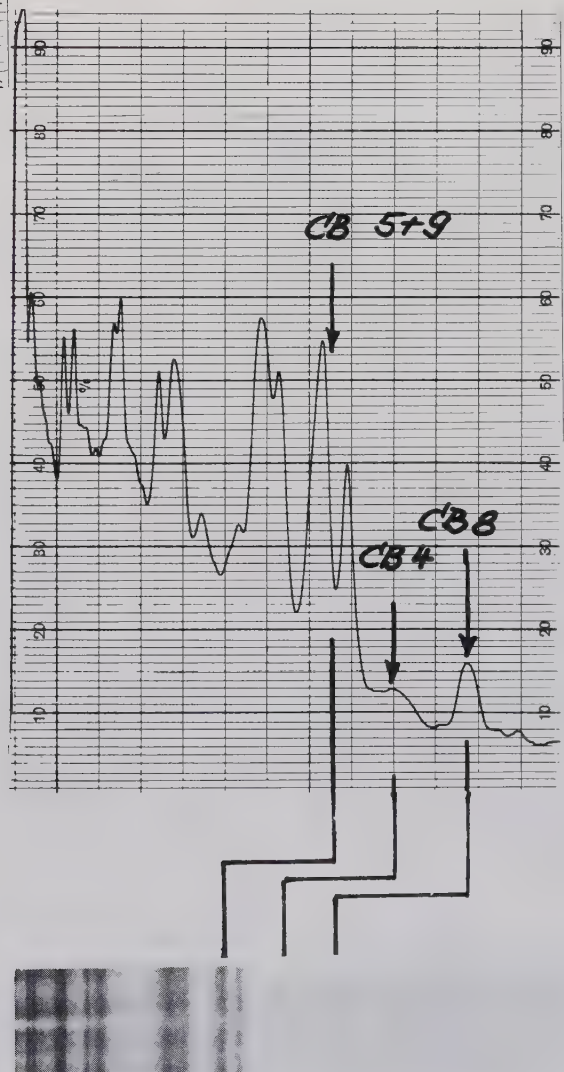
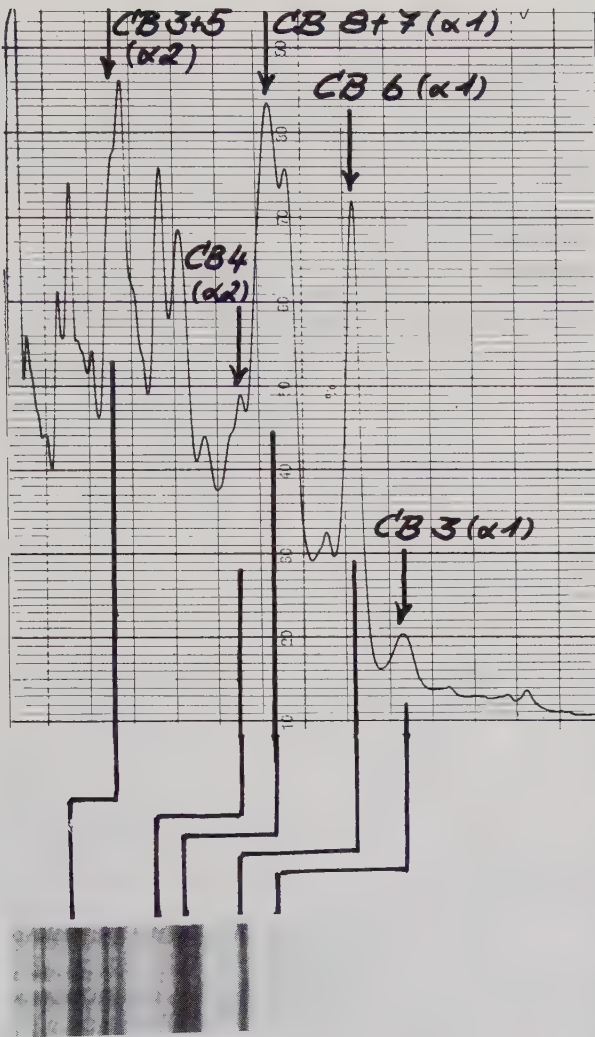
Probe 4* :

Es handelt sich um eine gepoolte Probe der 29. bzw. 32. SSW. Das Sektionsprotokoll weist in beiden Fällen auf fetale Atelektasen und Lungenunreife hin.

Das Trennungsverhalten läßt zunächst Abweichungen erkennen. Nach Pepsin-Verdauung, Zentrifugation, 1. Salzfällung und Dialyse gegen 0,05 M Tris-HCl/1 M NaCl sowie gegen 0,5 M Essigsäure löst sich die lyophilisierte Probe schlecht in 0,05 M Tris-HCl/1 M NaCl (2. Salzfällung). Nach 4 Tagen sind noch feste Bestandteile erkennbar, die durch anschließende Zentrifugation mit 15.000 U/min und bei 4°C über 2 Stunden entfernt werden. Der klare Überstand läßt sich gut abgießen und wird auf 5 M NaCl gefällt. Das nach erneuter Zentrifugation gewonnene Präzipitat wird - wie der bei der vorherigen Zentrifugation gewonnene Rückstand R₂ - in 0,5 M Essigsäure gelöst und ausgiebig gegen destilliertes Wasser dialysiert. Die Dialysate werden lyophilisiert und ihr Kollagengehalt bestimmt.

Es fällt auf, das mehr Typ III isoliert werden kann und es somit zu einer Verschiebung der Mengenrelation Typ III : Typ I zugunsten von Typ III kommt.

Die anschließende Reinigung der Proben nach Cyanogenbromid-Spaltung zeigt bei Typ I-Kollagen klare Fraktionen, bei Typ III eine Braunfärbung der Kollagenfraktionen 4 und 5.



Probe wird in 0,5 M Essigsäure
24 h bei 4°C gewaschen

Pepsin-Verdauung :

0,1 mg Pepsin/mg TG in 2 Fraktio-
nen, 72 h bei 4°C und pH = 2,5
2 h zentr. (15.000 U/min, 4°C)
Rückstand R₀ in 0,5 M Essigsäure
spülen, 2 h zentr., Überstände
poolen und auf Kollagen fällen

Salzfällung :

gepoolte Überstände (Ü) über
Nacht mit 0,9 M NaCl (52,6 mg
NaCl/ml Ü) bei 4°C auf Kollagen
fällen

Präzipitat 2 h zentr.

abzentr. Präzipitat lösen in u.
dialysieren gegen 0,05 M Tris-
HCl/1 M NaCl (pH=7,5) bei 4°C

Dialysat 2 h zentr.

Überstand gegen 0,5 M Essigsäure
bei 4°C dialysieren

Rückstand R₁ lösen in und dialy-
sieren gegen 0,5 M Essigsäure

beide Fraktionen lyophilisieren

Salzfällung :

Lyophilisat von Ü in 0,05 M
Tris-HCl/1 M NaCl-Puffer lösen
(pH = 7,5 , 1 ml P./mg Lyo.)

Präzipitat 2 h zentr.

Schritte zur Iso- lierung v. Typ I

Ü über Nacht auf 5 M
NaCl (+ 4 M NaCl)
fällen

2 h zentrifugieren

Präzipitat lösen in
0,5 M Essigsäure u.
Dial. g. H₂O_{dest}

24 h lyophilisieren

SSW : 29./32.
Proben-Nr. 4*
Kollagen : 6,02 %

Pepsin-Verdauung :
Einsatz : 900 mg
Kollagen: 6,02 %

R₀ gepoolt :
TG : 237,65 mg
Koll. 3,91 %

1. Salzfällung :
mit 0,9 M NaCl
Ü : 43 ml
NaCl: 2261,8 mg

2 h zentrifugieren

Dialyse gegen 0,05 M
Tris-HCl/1 M NaCl

2 h zentrifugieren

Dialyse gegen 0,5 M
Essigsäure

24 h lyophilis.

Überstand :
TG : 36,40 mg
Koll. 74,44 %

R₁ :
TG : 0,85 mg
Koll. 9 54 %

2. Salzfällung :
Einsatz : 35,82 mg
Kollagen: 74,44 %

2 h zentrifugieren

Schritte zur Iso- lierung v. Typ III

Rückstand R₂ lösen in
0,5 M Essigsäure u.
Dial. g. H₂O_{dest}

24 h lyophilisieren

3. Salzfällung
mit 5 M NaCl
Ü : 33 ml
NaCl: 7,72 g

2 h zentr.

Dialyse g. H₂O

24 h lyophil.

Koll. Typ I
TG : 8,27 mg
Koll. 80,3 %

Dialyse g. H₂O

24 h lyophil.

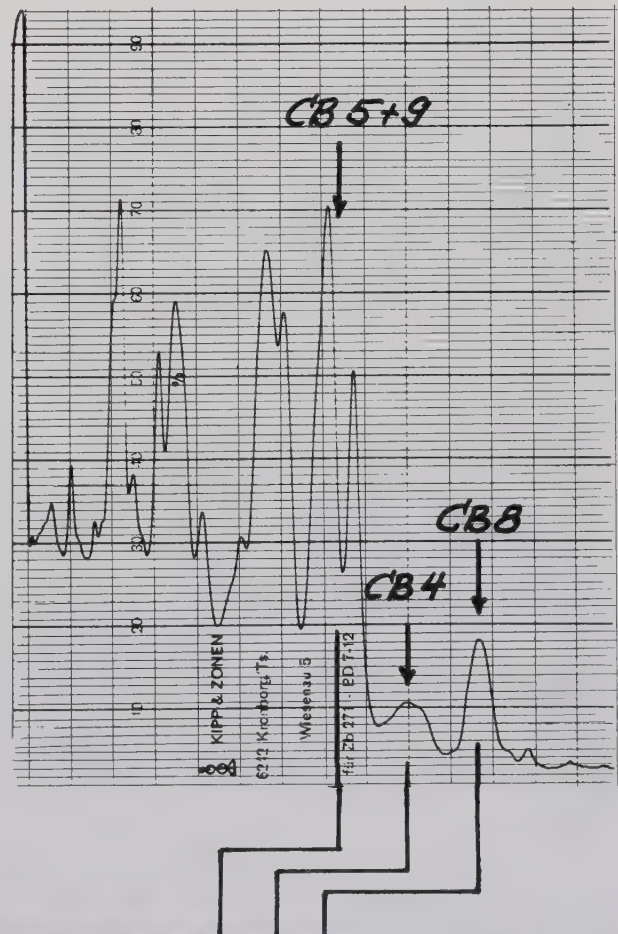
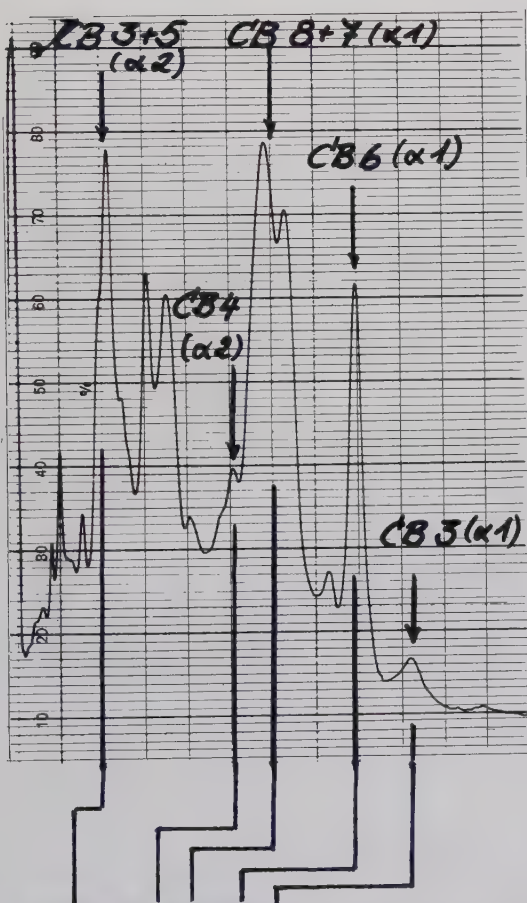
Koll. Typ III
TG : 20,30 mg
Koll. 69,94 %

Probe 5* :

Diese Totgeburt aus der 37. Schwangerschaftswoche zeigt makroskopisch Mißbildungen des Abdomens (Gastroischisis, Evisceration, Non-Rotation des Darmes) Die Lunge weist makroskopisch keine Veränderungen auf, mikroskopisch finden sich beiderseits fetale Atelektasen sowie frische Thrombembolien beider Pulmonalarterienäste.

Die Extraktion der Kollagentypen I und III verläuft erwartungsgemäß.

Die CB-Spaltung zeigt erneut klare Kollagenfraktionen bei Typ I-Kollagen sowie bräunliche Verfärbungen der entsprechenden Fraktionen des Types III.



Probe wird in 0,5 M Essigsäure
24 h bei 4°C gewaschen

Pepsin-Verdauung :

0,1 mg Pepsin/mg TG in 2 Fraktionen,
72 h bei 4°C und pH = 2,5
2 h zentr. (15.000 U/min, 4°C)
Rückstand R₀ in 0,5 M Essigsäure
spülen, 2 h zentr., Überstände
poolen und auf Kollagen fällen

Salzfällung :

gepoolte Überstände (Ü) über
Nacht mit 0,9 M NaCl (52,6 mg
NaCl/ml Ü) bei 4°C auf Kollagen
fällen

Präzipitat 2 h zentr.

abzentr. Präzipitat lösen in u.
dialysieren gegen 0,05 M Tris-
HCl/1 M NaCl (pH=7,5) bei 4°C

Dialysat 2 h zentr.

Überstand gegen 0,5 M Essigsäure
bei 4°C dialysieren
Rückstand R₁ lösen in und dialy-
sieren gegen 0,5 M Essigsäure

beide Fraktionen lyophilisieren

Salzfällung :

Lyophilisat von Ü in 0,05 M
Tris-HCl/1 M NaCl-Puffer lösen
(pH = 7,5 , 1 ml P./mg Lyo.)

Präzipitat 2 h zentr.

Schritte zur Iso-
lierung v. Typ I

Ü über Nacht auf 5 M
NaCl (+ 4 M NaCl)
fällen

2 h zentrifugieren

Präzipitat lösen in
0,5 M Essigsäure u.
Dial. g H₂O_{dest}

24 h lyophilisieren

SSW	: 37.
Proben-Nr.	5*
Kollagen	: 8,21 %

Pepsin-Verdauung :	
Einsatz	: 1200 mg
Kollagen	: 8,21 %

R ₀ gepoolt :	
TG	: 361,18 mg
Koll.	: 2,75 %

1. Salzfällung :	
mit 0,9 M NaCl	
Ü	: 70 ml
NaCl	: 3682,0 mg

2 h zentrifugieren

Dialyse gegen 0,05 M
Tris-HCl/1 M NaCl

2 h zentrifugieren

Dialyse gegen 0,5 M
Essigsäure

24 h lyophilis.

Überstand :	
TG	: 60,46 mg
Koll.	: 83,25 %

R ₁ :	
TG	: 0,98 mg
Koll.	: 9,12 %

2. Salzfällung :	
Einsatz	: 59,22 mg
Koll.	: 83,25 %

2 h zentrifugieren

Schritte zur Iso-
lierung v. Typ III

3. Salzfällung	
mit 5 M NaCl	
Ü	: 56 ml
NaCl	: 13,09 g

2 h zentr.

Dialyse g. H₂O

24 h lyophil.

Koll. Typ I	
TG	: 22,91 mg
Koll.	: 99,33 %

Dialyse g. H₂O

24 h lyophil.

Koll. Typ III	
TG	: 25,99 mg
Koll.	: 79,93 %

Rückstand R₂ lösen in
0,5 M Essigsäure u.
Dial. g. H₂O_{dest}

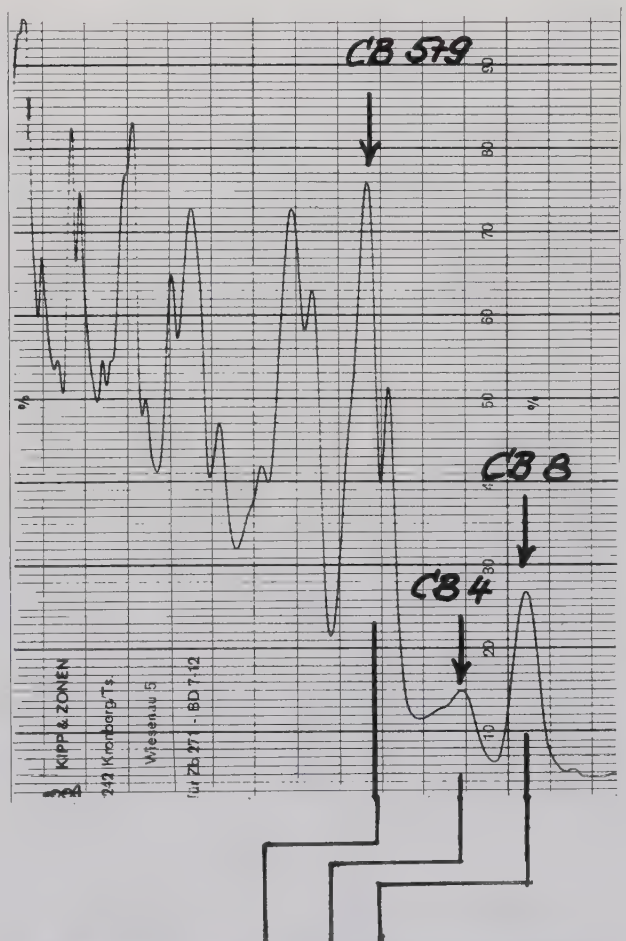
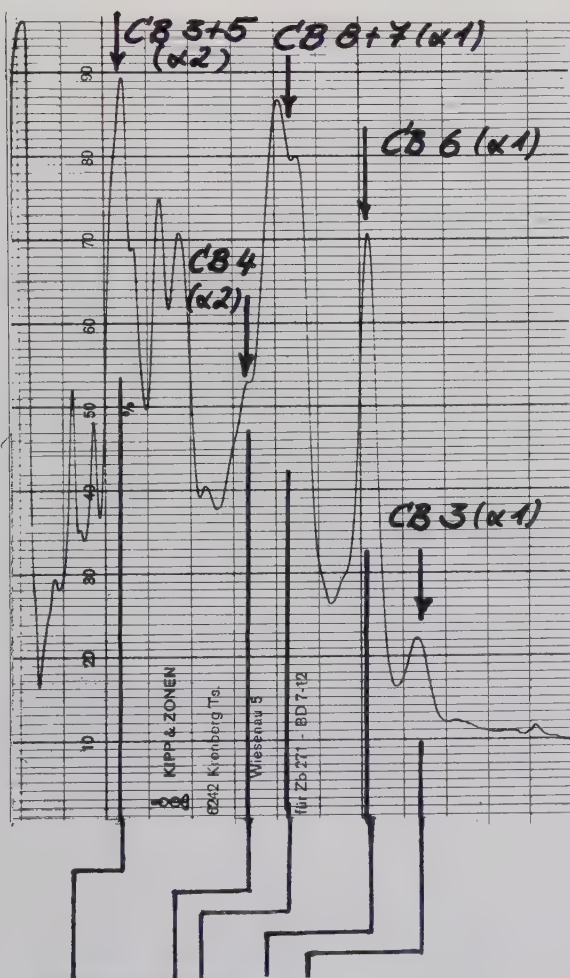
24 h lyophilisieren

Probe 6* :

Es liegt eine Probe mit intrauterinem Fruchttod in der 37. Schwangerschaftswoche infolge erheblicher Vaskularisationsstörungen der Plazenta vor. Die Lungen des Feten zeigen eine massive Fruchtwasseraspiration, Atelektasen sowie eine Lungenunreife.

Die Isolierung der Kollagentypen I und III verläuft ohne Auffälligkeiten.

Die Fraktionen 4, 5 und 6 der Cyanogenbromid-Spaltung sind bei Typ I klar, bei Typ III braun verfärbt.



Probe wird in 0,5 M Essigsäure
24 h bei 4°C gewaschen

Pepsin-Verdauung :

0,1 mg Pepsin/mg TG in 2 Fraktionen,
72 h bei 4°C und pH = 2,5
2 h zentr. (15.000 U/min, 4°C)
Rückstand R₀ in 0,5 M Essigsäure
spülen, 2 h zentr., Überstände
poolen und auf Kollagen fällen

Salzfällung :

gepoolte Überstände (Ü) über
Nacht mit 0,9 M NaCl (52,6 mg
NaCl/ml Ü) bei 4°C auf Kollagen
fällen

Präzipitat 2 h zentr.

abzentr. Präzipitat lösen in u.
dialysieren gegen 0,05 M Tris-
HCl/1 M NaCl (pH=7,5) bei 4°C

Dialysat 2 h zentr.

Überstand gegen 0,5 M Essigsäure
bei 4°C dialysieren
Rückstand R₁ lösen in und dialy-
sieren gegen 0,5 M Essigsäure

beide Fraktionen lyophilisieren

Salzfällung :

Lyophilisat von Ü in 0,05 M
Tris-HCl/1 M NaCl-Puffer lösen
(pH = 7,5 , 1 ml P./mg Lyo.)

Präzipitat 2 h zentr.

Schritte zur Iso-
lierung v. Typ I

Ü über Nacht auf 5 M
NaCl (+ 4 M NaCl)
fällen

2 h zentrifugieren

Präzipitat lösen in
0,5 M Essigsäure u.
Dial. g. H₂O_{dest}

24 h lyophilisieren

SSW : 37.
Proben-Nr. 6*
Kollagen : 6,14 %

Pepsin-Verdauung :
Einsatz : 1000 mg
Kollagen: 6,14 %

R₀ gepoolt :
TG : 278,49 mg
Koll. 2,39 %

1. Salzfällung :
mit 0,9 M NaCl
Ü : 66 ml
NaCl: 3471,6 mg

2 h zentrifugieren

Dialyse gegen 0,05 M
Tris-HCl/1 M NaCl

2 h zentrifugieren

Dialyse gegen 0,5 M
Essigsäure

24 h lyophilis.

Überstand :
TG : 42,93 mg
Koll. 90,20 %

R₁ :
TG : 1,49 mg
Koll. 2,69 %

2. Salzfällung :
Einsatz : 41,40 mg
Koll. 90,20 %

2 h zentrifugieren

Schritte zur Iso-
lierung v. Typ III

Rückstand R₂ lösen in
0,5 M Essigsäure u.
Dial. g. H₂O_{dest}

24 h lyophilisieren

3. Salzfällung
mit 5 M NaCl
Ü : 47 ml
NaCl: 10,99 g

2 h zentr.

Dialyse g. H₂O

24 h lyophil.

Koll. Typ I
TG : 17,45 mg
Koll. 87,77 %

Dialyse g. H₂O

24 h lyophil.

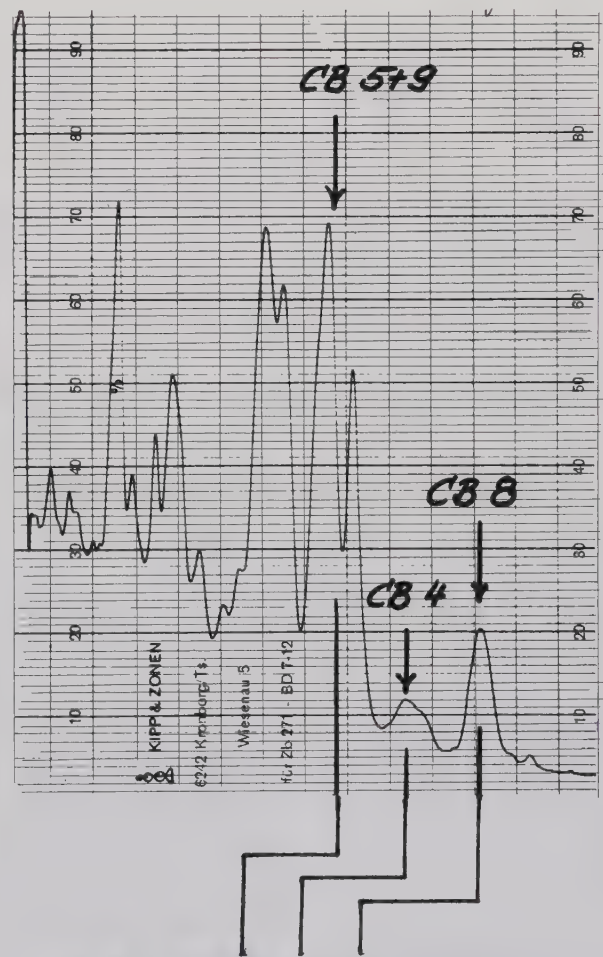
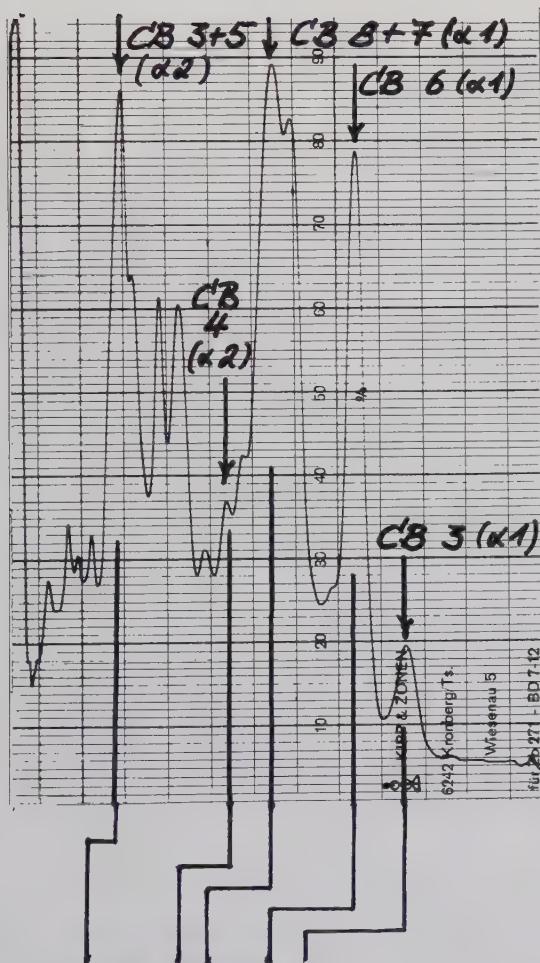
Koll. Typ III
TG : 14,27 mg
Koll. 97,48 %

Probe 7* :

Es liegt das Gewebe eines 8 Tage alten Neugeborenen mit einem Vitium cordis connatum, Schockorganen und einer eitrigen Meningitis vor. Histologisch zeigt die Lunge eine katarrhale Tracheobronchitis, basale Atelektasen und ein Lungenödem.

Die Aufarbeitung des Trockengewebes zur Isolierung der Kollagentypen I und III zeigt keine Abweichungen im Verlauf.

Alle CB-Fractionen beider Kollagentypen sind klar. Eine Braunfärbung der Fractionen bei Typ III fehlt.



Probe wird in 0,5 M Essigsäure
24 h bei 4°C gewaschen

Pepsin-Verdauung :

0,1 mg Pepsin/mg TG in 2 Fraktionen,
72 h bei 4°C und pH = 2,5
2 h zentr. (15.000 U/min , 4°C)
Rückstand R₀ in 0,5 M Essigsäure
spülen, 2 h zentr. , Überstände
poolen und auf Kollagen fällen

Salzfällung :

gepoolte Überstände (Ü) über
nacht mit 0,9 M NaCl (52,6 mg
NaCl/ml Ü) bei 4°C auf Kollagen
fällen

Präzipitat 2 h zentr.

abzentr. Präzipitat lösen in u.
dialysieren gegen 0,05 M Tris-
HCl/1 M NaCl (pH=7,5) bei 4°C

Dialysat 2 h zentr.

Überstand gegen 0,5 M Essigsäure
bei 4°C dialysieren

Rückstand R₁ lösen in und dialy-
sieren gegen 0,5 M Essigsäure

beide Fraktionen lyophilisieren

Salzfällung :

Lyophilisat von Ü in 0,05 M
Tris-HCl/1 M NaCl-Puffer lösen
(pH = 7,5 , 1 ml P./mg Lyo.)

Präzipitat 2 h zentr.

Schritte zur Iso- lierung v. Typ I

Ü über Nacht auf 5 M
NaCl (+ 4 M NaCl)
fällen

2 h zentrifugieren

Präzipitat lösen in
0,5 M Essigsäure u.
Dial. g. H₂O_{dest}

24 h lyophilisieren

SSW	:	Termin
Proben-Nr.	:	7*
Kollagen	:	8,66 %

Pepsin-Verdauung :	
Einsatz :	1000 mg
Kollagen :	8,66 %

R ₀ gepoolt :	
TG :	269,8 mg
Koll.	3,10 %

1. Salzfällung :	
mit	0,9 M NaCl
Ü :	66 ml
NaCl:	3471,6 mg

2 h zentrifugieren

Dialyse gegen 0,05 M
Tris-HCl/1 M NaCl

2 h zentrifugieren

Dialyse gegen 0,5 M
Essigsäure

24 h lyophilis.

Überstand :	
TG :	60,84 mg
Koll.	90,60 %

R ₁ :	
TG :	0,59 mg
Koll.	68,59 %

2. Salzfällung :	
Einsatz :	59,20 mg
Koll.	90,60 %

2 h zentrifugieren

Schritte zur Iso- lierung v. Typ III

3. Salzfällung	
mit	5 M NaCl
Ü :	63 ml
NaCl:	14,73 g

2 h zentr.

Dialyse g. H₂O

24 h lyophil.

Koll. Typ I	
TG :	18,66 mg
Koll.	87,47 %

Dialyse g. H₂O

24 h lyophil.

Koll. Typ III	
TG :	27,71 mg
Koll.	94,37 %

Rückstand R₂ lösen in
0,5 M Essigsäure u.
Dial. g. H₂O_{dest}

24 h lyophilisieren

Probe 8* :

Diese Lunge, die fetale Atelektasen aufweist, stammt von einem termingerechten Totgeborenen.

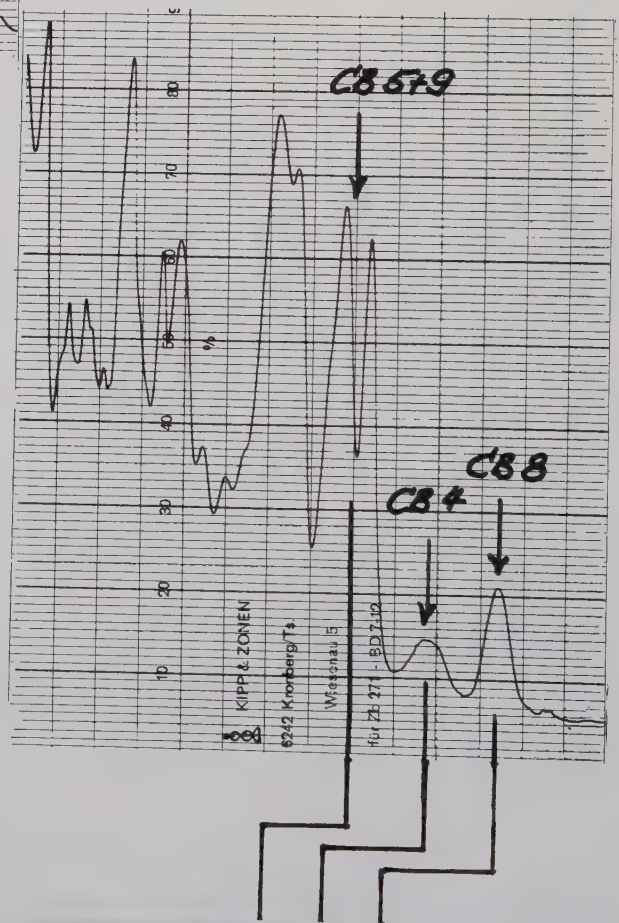
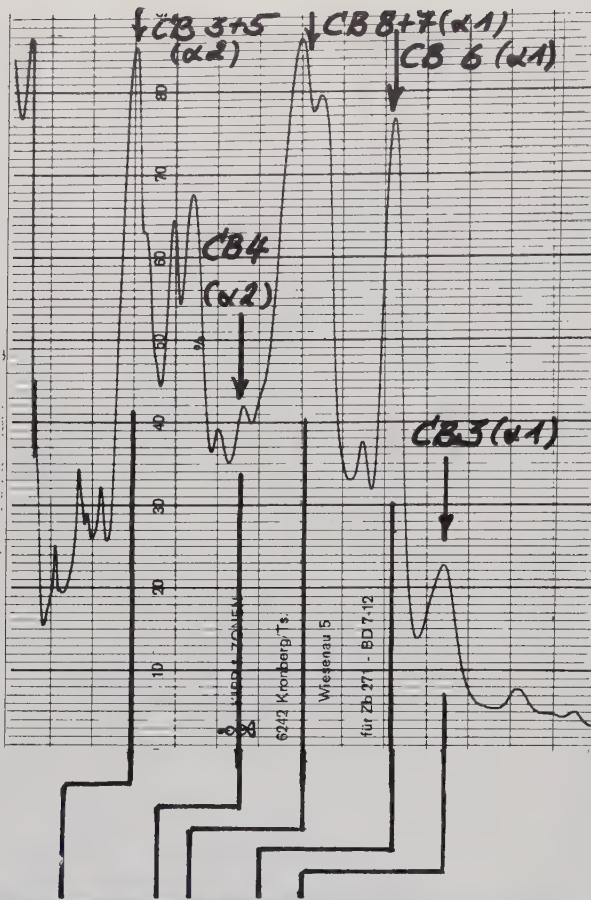
Bei der Extraktion der Kollagentypen kommt es nach Pepsin-Verdauung und 2-stündiger Zentrifugation (15.000 U/min, 4°C) nicht zu einer Trennung von Überstand und Präzipitat R₀. Die Probe wirkt auch sehr zähflüssig und wird erneut unter bekannten Bedingungen zentrifugiert. Auch jetzt läßt sich der Überstand nicht vollständig abgießen, ohne daß R₀ mitläuft. Es werden erneut 2 h Zentrifugation angeschlossen. Jetzt läuft der Rückstand an der Wand des Zentrifugenglases herunter, nachdem der klare Überstand abgegossen werden kann.

Im weiteren Verlauf der Isolierung der Kollagentypen zeigt sich eine geringe Löslichkeit des 1. Lyophilisates in 0,05 M Tris-HCl/ 1 M NaCl. Nach 5 Tagen sind immer noch ungelöste Bestandteile erkennbar, die abzentrifugiert werden.

Die weiteren Analyseschritte verlaufen planmäßig.

Nach Bestimmung der Menge und des Gehaltes beider isolierter Kollagentypen fällt auf, daß es zu einer Verschiebung der Mengenrelation Typ III : Typ I zugunsten Typ III-Kollagen gekommen ist.

Bei der anschließenden Reinigung der Proben nach Cyanogenbromid-Spaltung treten erneut Verfärbungen der Fraktionen 4 - 6 des Kollagentypes III auf. Die entsprechenden Fraktionen von Typ I sind klar.



Probe wird in 0,5 M Essigsäure
24 h bei 4°C gewaschen

Pepsin-Verdauung :

0,1 mg Pepsin/mg TG in 2 Fraktio-
nen, 72 h bei 4°C und pH = 2,5
2 h zentr. (15.000 U/min, 4°C)
Rückstand R₀ in 0,5 M Essigsäure
spülen, 2 h zentr., Überstände
poolen und auf Kollagen fällen

Salzfällung :

gepoolte Überstände (Ü) über
Nacht mit 0,9 M NaCl (52,6 mg
NaCl/ml Ü) bei 4°C auf Kollagen
fällen

Präzipitat 2 h zentr.

abzentr. Präzipitat lösen in u.
dialysieren gegen 0,05 M Tris-
HCl/1 M NaCl (pH=7,5) bei 4°C

Dialysat 2 h zentr.

Überstand gegen 0,5 M Essigsäure
bei 4°C dialysieren
Rückstand R₁ lösen in und dialy-
sieren gegen 0,5 M Essigsäure

beide Proben lyophilisieren

Salzfällung :

Lyophilisat von Ü in 0,05 M
Tris-HCl/1 M NaCl-Puffer lösen
(pH = 7,5, 1 ml P./mg Lyo.)

Präzipitat 2 h zentr.

Schritte zur Iso-
lierung v. Typ I

Ü über Nacht auf 5 M
NaCl (+ 4 M NaCl)
fällen

2 h zentrifugieren

Präzipitat lösen in
0,5 M Essigsäure u.
Dial. g. H₂O_{dest}

24 h lyophilisieren

3. Salzfällung
mit 5 M NaCl
Ü : 65 ml
NaCl: 15,19 g

2 h zentr.

Dialyse g. H₂O

24 h lyophil.

Koll. Typ I
TG : 19,85 mg
Koll. 92,33 %

SSW : Termin
Proben-Nr. 8*
Kollagen : 11,33 %

Pepsin-Verdauung :
Einsatz : 1200 mg
Kollagen: 11,33 %

1. Salzfällung :
mit 0,9 M NaCl
Ü : 80 ml
NaCl: 4208,0 mg

2 h zentrifugieren

Dialyse gegen 0,05 M
Tris-HCl/1 M NaCl

2 h zentrifugieren

Dialyse gegen 0,5 M
Essigsäure

24 h lyophilis.

Überstand :
TG : 68,94 mg
Koll. 88,51 %

2. Salzfällung :
Einsatz : 67,74 mg
Koll. 88,51 %

2 h zentrifugieren

Dialyse g. H₂O

24 h lyophil.

Koll. Typ III
TG : 36,54 mg
Koll. 87,07 %

R₀ gepoolt :
TG : 223,67 mg
Koll. 4,18 %

R₁ :
TG : 3,18 mg
Koll. 58,46 %

Schritte zur Iso-
lierung v. Typ III

Rückstand R₂ lösen in
0,5 M Essigsäure u.
Dial. g. H₂O_{dest}

24 h lyophilisieren

Probe 9* :

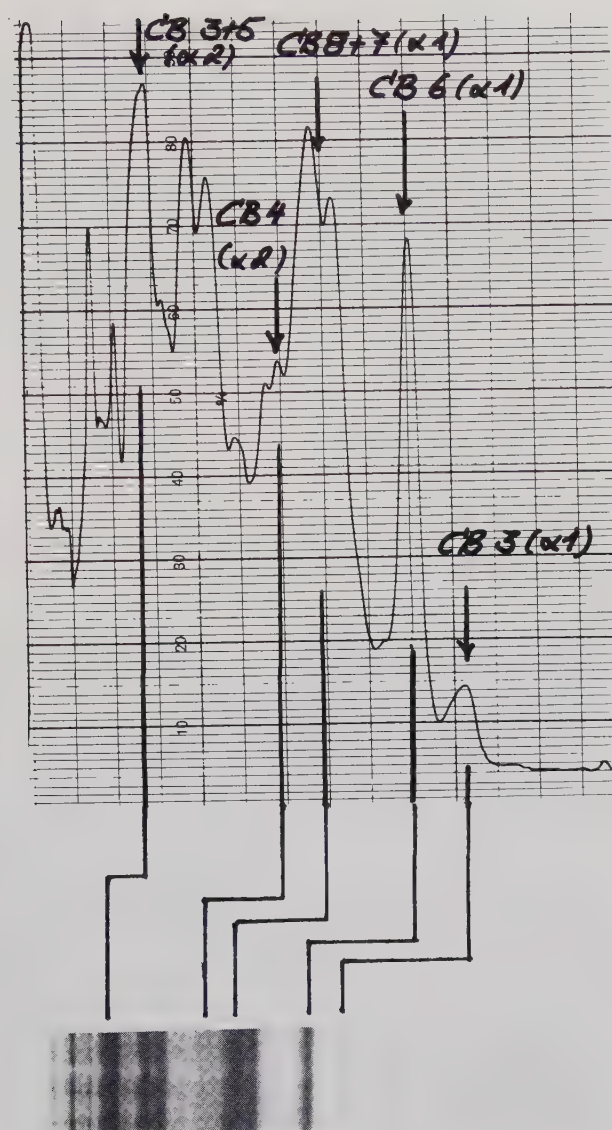
Das Material dieser Probe wird zunächst zur Kollagenspaltung ohne Isolierung der Typen I und III verwendet. Der Ablauf der Analyse zeigt hier keine Auffälligkeiten (vgl. 16[#]). Da ausreichend Material vorhanden ist, wird die Typenisolierung angeschlossen. Dabei zeigen sich Abweichungen.

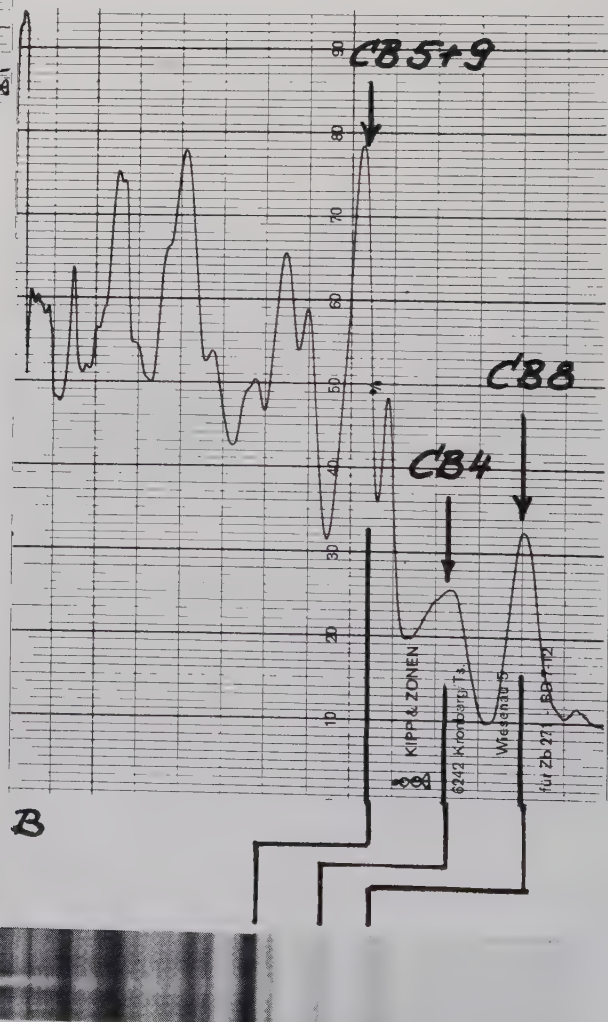
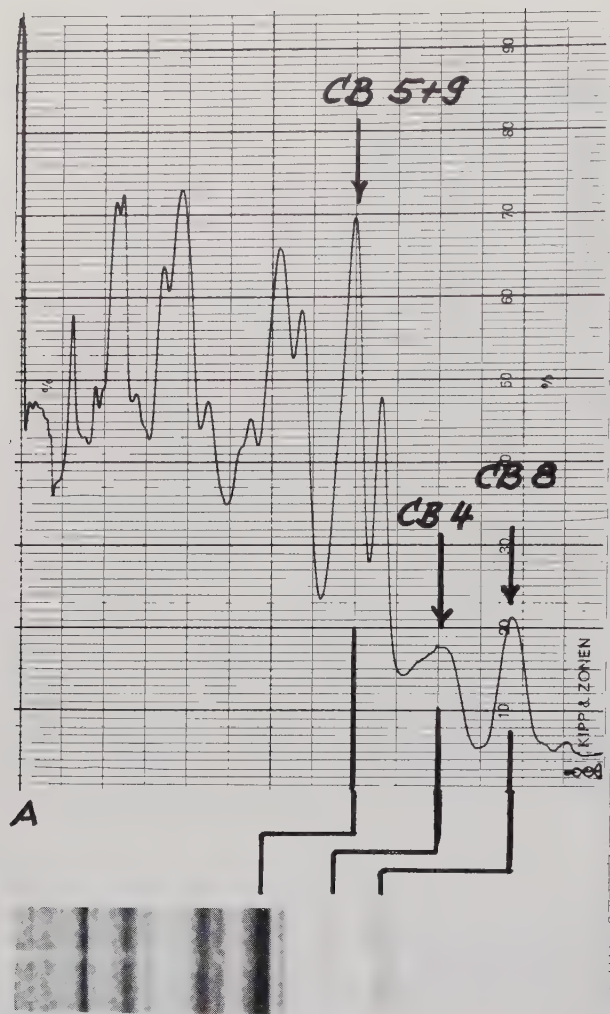
Schon beim Aufschwemmen des Trockenmaterials in 0,5 M Essigsäure setzt sich an der Oberfläche ein weißer Schaum ab, der auch bei geringerem Rühren erhalten bleibt. Er ist nach Pepsin-Verdauung und Salzfällung weiter zu finden. Es kann aber eine gute Trennung von Überstand und Rückstand R_0 erreicht werden.

Es folgen 1. Salzfällung, Zentrifugation des Präzipitats unter bekannten Bedingungen, Lösen in und Dialyse gegen 0,05 M Tris-HCl/1 M NaCl und erneute Zentrifugation. Ein Abgießen des klaren Überstandes gelingt nur unvollständig, da sich der Rückstand R_1 nicht fest abgestzt hat und beim Abgießen mitläuft.

Nach dem anschließenden Lyophilisieren beider Bestandteile, erhält man eine relativ große Menge R_1 mit einem hohen Kollagengehalt, so daß beide Kompartimente weiter aufgearbeitet werden. Es folgt das Lösen der Lyophilisate in 0,05 M Tris-HCl/1 M NaCl, die erneute Zentrifugation unter bekannten Bedingungen und die 3. Salzfällung auf 5 M NaCl. Nach Abzentrifugieren des Präzipitats und seinem Lösen in 0,5 M Essigsäure (wie auch der Rückstand R_2 , der bei der nach der 2. Salzfällung gewonnen wird) wird gegen Aqua dest. dialysiert sowie anschließend beide Produkte lyophilisiert.

Die CB-Spaltung zeigt wie erwartet klare Kollagenfraktionen bei Typ I sowie braune Verfärbungen bei Typ III.





A

Probe wird in 0,5 M Essigsäure
24 h bei 4°C gewaschen

Pepsin-Verdauung :

0,1 mg Pepsin/mg TG in 2 Fraktionen,
72 h bei 4°C und pH = 2,5
2 h zentr. (15.000 U/min, 4°C)
Rückstand R₀ in 0,5 M Essigsäure
spülen, 2 h zentr., Überstände
poolen und auf Kollagen fällen

Salzfällung :

gepoolte Überstände (Ü) über
Nacht mit 0,9 M NaCl (52,6 mg
NaCl/ml Ü) bei 4°C auf Kollagen
fällen

Präzipitat 2 h zentr.

abzentr. Präzipitat lösen in u.
dialysieren gegen 0,05 M Tris-
HCl/1 M NaCl (pH=7,5) bei 4°C

Dialysat 2 h zentr.

Überstand gegen 0,5 M Essigsäure
bei 4°C dialysieren
Rückstand R₁ lösen in und dialy-
sieren gegen 0,5 M Essigsäure

beide Fraktionen lyophilisieren

Salzfällung :

Lyophilisat von Ü in 0,05 M
Tris-HCl/1 M NaCl-Puffer lösen
(pH = 7,5, 1 ml P./mg Lyo.)

Präzipitat 2 h zentr.

Schritte zur Iso-
lierung v. Typ I

Ü über Nacht auf 5 M
NaCl (+ 4 M NaCl)
fällen

2 h zentrifugieren

Präzipitat lösen in
0,5 M Essigsäure u.
dial. g. H₂O_{dest}

4 h lyophilisieren

Alter : 2. Lm.
Proben-Nr. 9*
Kollagen : 10,16 %

Pepsin-Verdauung :
Einsatz : 1000 mg
Kollagen: 10,16 %

R₀ gepoolt :
TG : 269,09 mg
Koll. 4,51 %

1. Salzfällung :
mit 0,9 M NaCl
Ü : 41,5 ml
NaCl: 2182,9 mg

2 h zentrifugieren

Dialyse gegen 0,05 M
Tris-HCl/1 M NaCl

2 h zentrifugieren

Dialyse gegen 0,5 M
Essigsäure

24 h lyophilis.

Überstand :
TG : 43,10 mg
Koll. 86,59 %

R₁ (s. unter B) :
TG : 7,50 mg
Koll. 70,21 %

2. Salzfällung :
Einsatz : 42,05 mg
Koll. 86,59 %

2 h zentrifugieren

Schritte zur Iso-
lierung v. Typ III

3. Salzfällung
mit 5 M NaCl
Ü : 43 ml
NaCl: 10,05 g

2 h zentr.

Dialyse g. H₂O

24 h lyophil.

Koll. Typ I
TG : 17,04 mg
Koll. 89,45 %

Dialyse g. H₂O

24 h lyophil.

Koll. Typ III
TG : 17,99 mg
Koll. 89,52 %

Rückstand R₂ lösen in
0,5 M Essigsäure u.
Dial. g. H₂O_{dest}

24 h lyophilisieren

B

Probe wird in 0,5 M Essigsäure
24 h bei 4°C gewaschen

Pepsin-Verdauung :

0,1 mg Pepsin/mg TG in 2 Fraktionen,
72 h bei 4°C und pH = 2,5
2 h zentr. (15.000 U/min, 4°C)
Rückstand R₀ in 0,5 M Essigsäure
spülen, 2 h zentr., Überstände
poolen und auf Kollagen fällen

Salzfällung :

gepoolte Überstände (Ü) über
Nacht mit 0,9 M NaCl (52,6 mg
NaCl/ml Ü) bei 4°C auf Kollagen
fällen

Präzipitat 2 h zentr.

abzentr. Präzipitat lösen in u.
dialysieren gegen 0,05 M Tris-
HCl/1 M NaCl (pH=7,5) bei 4°C

Dialysat 2 h zentr.

Überstand gegen 0,5 M Essigsäure
bei 4°C dialysieren
Rückstand R₁ lösen in und dialy-
sieren gegen 0,5 M Essigsäure

beide Fraktionen lyophilisieren

Salzfällung :

Lyophilisat von R₁ in 0,05 M
Tris-HCl/1 M NaCl-Puffer lösen
(pH = 7,5 , 1 ml P./mg Lyo.)

Präzipitat 2 h zentr.

Schritte zur Iso- lierung v. Typ I

Ü über Nacht auf 5 M
NaCl (+ 4 M NaCl)
fällen

2 h zentrifugieren

Präzipitat lösen in
0,5 M Essigsäure u.
Dial. g. H₂O_{dest}

24 h lyophilisieren

3. Salzfällung
mit 5 M NaCl
Ü : 11 ml
NaCl: 2,57 g

2 h zentr.

Dialyse g. H₂O

24 h lyophil.

Koll. Typ I
TG : 1,24 mg
Koll. 30,08 %

Alter : 2. Im.
Proben-Nr. 9*
Kollagen : 10,16 %

Pepsin-Verdauung :
Einsatz : 1000 mg
Kollagen: 10,16 %

R₀ gepoolt :
TG : 269,09 mg
Koll. 4,51 %

1. Salzfällung :
mit 0,9 M NaCl
Ü : 41,5 ml
NaCl: 2182,9 mg

2 h zentrifugieren

Dialyse gegen 0,05 M
Tris-HCl/1 M NaCl

2 h zentrifugieren

Dialyse gegen 0,5 M
Essigsäure

24 h lyophilis.

R₁ :
TG : 7,50 mg
Koll. 70,21 %

Ü (s. unter A) :
TG : 43,10 mg
Koll. 86,59 %

2. Salzfällung :
Einsatz : 6,73 mg
Koll. 70,21 %

2 h zentrifugieren

Schritte zur Iso- lierung v. Typ III

Rückstand R₂ lösen in
0,5 M Essigsäure u.
Dial. g. H₂O_{dest}

24 h lyophilisieren

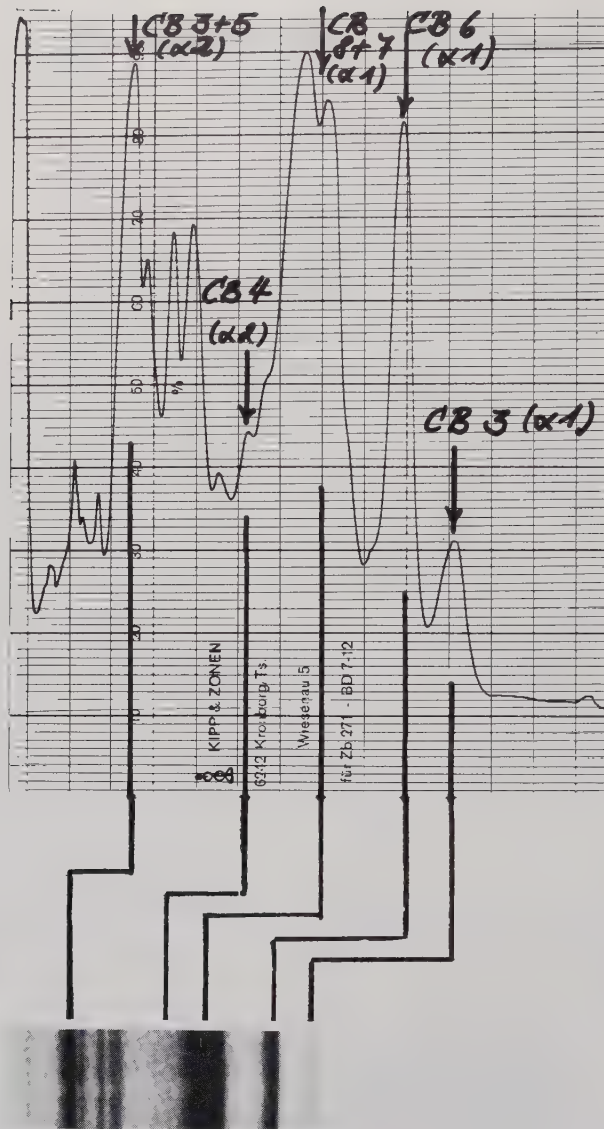
Koll. Typ III
TG : 4,17 mg
Koll. 68,86 %

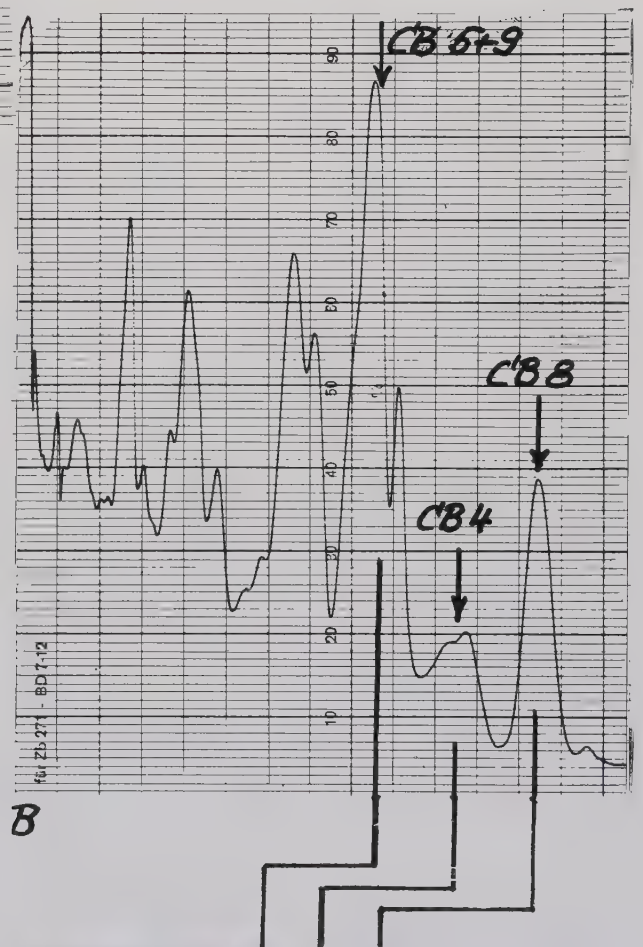
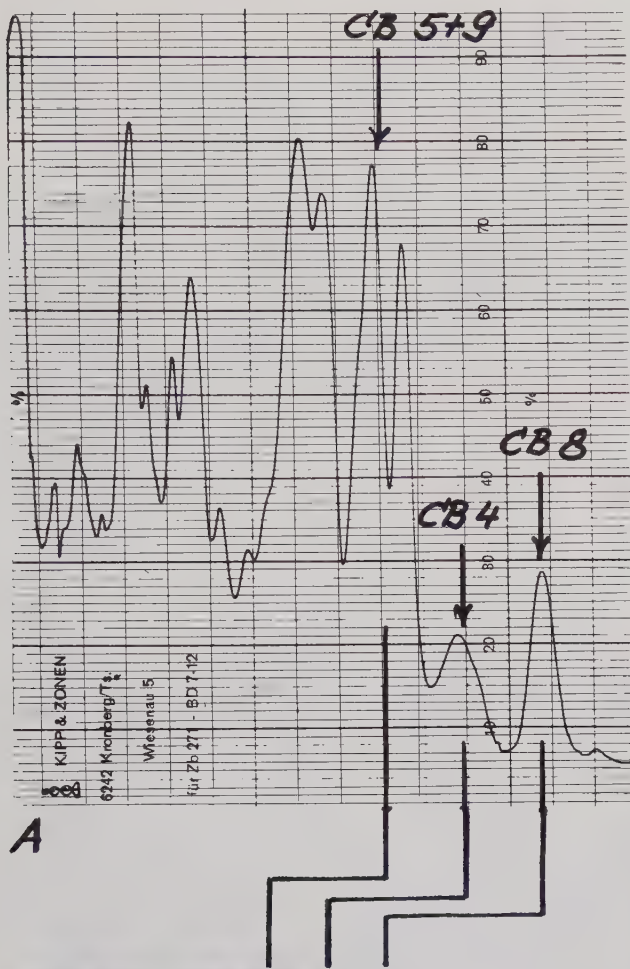
Probe 10* :

Es liegt das Gewebe eines 3 Monate und 3 Wochen alten Säuglings vor, der eine frische Schädelfraktur, ein Hirnödem, eine Aortenisthmusstenose und eine Rechtherzdilatation aufweist. Mikroskopisch finden sich in der Lunge kleine Atelektasen sowie eine geringe Blutstauung.

Nach Pepsinverdauung und Zentrifugation kann eine gute Trennung des klaren Überstandes vom Rückstand R_0 erreicht werden. Es folgen 1. Salzfällung, Zentrifugation unter bekannten Bedingungen, Lösen des Rückstandes in und Dialyse gegen 0,05 M Tris-HCl/1 M NaCl-Puffer, erneute Zentrifugation. Der gewonnene Rückstand R_1 läuft beim Abgießen des klaren Überstandes mit, so daß keine vollständige Trennung erreicht werden kann. R_1 wird in 0,5 M Essigsäure gelöst und wie der Überstand gegen diese dialysiert, bevor beide Fraktionen lyophilisiert werden. Nach dem Lyophilisieren macht die relativ große Menge von R_1 mit dem hohen Kollagengehalt eine weitere Aufarbeitung nötig. Die weiteren Analysenschritte können den Fließdiagrammen entnommen werden.

Die durchgeführte Cyanogenbromid-Spaltung zeigt die erwartete Verfärbung der Kollagenfraktionen des Types III sowie die klaren Fraktionen des Typs I.





A

Probe wird in 0,5 M Essigsäure
24 h bei 4°C gewaschen

Pepsin-Verdauung :

0,1 M Pepsin/mg TG in 2 Fraktionen,
72 h bei 4°C und pH = 2,5
2 h zentr. (15.000 U/min, 4°C)
Rückstand R₀ in 0,5 M Essigsäure
spülen, 2 h zentr., Überstände
poolen und auf Kollagen fällen

Salzfällung :

gepoolte Überstände (Ü) über
Nacht mit 0,9 M NaCl (52,6 mg
NaCl/ml Ü) bei 4°C auf Kollagen
fällen

Präzipitat 2 h zentr.

abzentr. Präzipitat lösen in u.
dialysieren gegen 0,05 M Tris-
HCl/1 M NaCl (pH=7,5) bei 4°C

Dialysat 2 h zentr.

Überstand gegen 0,5 M Essigsäure
bei 4°C dialysieren
Rückstand R₁ lösen in und dialy-
sieren gegen 0,5 M Essigsäure

beide Fraktionen lyophilisieren

Salzfällung :

Lyophilisat von Ü in 0,05 M
Tris-HCl/1 M NaCl-Puffer lösen
(pH = 7,5 , 1 ml P./mg Lyo.)

Präzipitat 2 h zentr.

Schritte zur Iso-
lierung v. Typ I

Ü über Nacht auf 5 M
NaCl (+ 4 M NaCl)
fällen

2 h zentrifugieren

Präzipitat lösen in
0,5 M Essigsäure u.
Dial. g. H₂O_{dest}

24 h lyophilisieren

3. Salzfällung
mit 5 M NaCl
Ü : 40 ml
NaCl:

2 h zentr.

Dialyse g. H₂O

24 h lyophil.

Koll. Typ I
TG : 19,75 mg
Koll. 86,86 %

Alter : 3 Mo & 3 Wo
Proben-Nr. 10*
Kollagen : 7,13 %

Pepsin-Verdauung :
Einsatz : 1000 mg
Kollagen: 7,13 %

1. Salzfällung :
mit 0,9 M NaCl
Ü : 42 ml
NaCl: 2209,2 mg

2 h zentrifugieren

Dialyse gegen 0,05 M
Tris-HCl/1 M NaCl

2 h zentrifugieren

Dialyse gegen 0,5 M
Essigsäure

24 h lyophilis.

Überstand :
TG : 39,11 mg
Koll. 78,76 %

2. Salzfällung :
Einsatz : 38,14 mg
Koll. 78,76 %

2 h zentrifugieren

R₀ gepoolt :
TG : 242,24 %
Koll. 2,85 %

R₁ (s. unter B) :
TG : 12,01 mg
Koll. 97,79 %

Schritte zur Iso-
lierung v. Typ III

Rückstand R₂ lösen in
0,5 M Essigsäure u.
Dial. g. H₂O_{dest}

24 h lyophilisieren

Koll. Typ III
TG : 11,01 mg
Koll. 80,82 %

B

Probe wird in 0,5 M Essigsäure
24 h bei 4°C gewaschen

Pepsin-Verdauung :

0,1 mg Pepsin/mg TG in 2 Fraktio-
nen, 72 h bei 4°C und pH = 2,5
2 h zentr. (15.000 U/min, 4°C)
Rückstand R₀ in 0,5 M Essigsäure
spülen, 2 h zentr. , Überstände
poolen und auf Kollagen fällen

Salzfällung :

gepoolte Überstände (Ü) über
Nacht mit 0,9 M NaCl (52,6 mg
NaCl/ml Ü) bei 4°C auf Kollagen
fällen

Präzipitat 2 h zentr.

abzentr. Präzipitat lösen in u.
dialysieren gegen 0,05 M Tris-
HCl/1 M NaCl (pH=7,5) bei 4°C

Dialysat 2 h zentr.

Überstand gegen 0,5 M Essigsäure
bei 4°C dialysieren
Rückstand R₁ lösen in und dialy-
sieren gegen 0,5 M Essigsäure

beide Fraktionen lyophilisieren

Salzfällung :

Lyophilisat von R₁ in 0,05 M
Tris-HCl/1 M NaCl-Puffer lösen
(pH = 7,5 , 1 ml P./mg Lyo.)

Präzipitat 2 h zentr.

Schritte zur Iso-
lierung v. Typ I

Ü über Nacht auf 5 M
NaCl (+ 4 M NaCl)
fällen

2 h zentrifugieren

Präzipitat lösen in
0,5 M Essigsäure u.
Dial. g. H₂O_{dest}

24 h lyophilisieren

3. Salzfällung
mit 5 M NaCl
Ü : 12 ml
NaCl: 2,81 g

2 h zentr.

Dialyse g. H₂O

24 h lyophil.

Koll. Typ I
TG : 0,40 mg
Koll. 34,50 %

Alter : 3 Mo & 3 Wo
Proben-Nr. 10*
Kollagen : 7,

Pepsin-Verdauung :
Einsatz : 1000 mg
Kollagen: 7,13 %

1. Salzfällung :
mit 0,9 M NaCl
Ü : 42 ml
NaCl: 2209,2 mg

2 h zentrifugieren

Dialyse gegen 0,05 M
Tris-HCl/1 M NaCl

2 h zentrifugieren

Dialyse gegen 0,5 M
Essigsäure

24 h lyophilis.

R₁ :
TG : 12,01 mg
Koll. 97,79 %

2. Salzfällung :
Einsatz : 10,88 mg
Kollagen: 97,79 %

2 h zentrifugieren

Dialyse g. H₂O

24 h lyophil.

Koll. Typ III
TG : 8,17 mg
Koll. 99,72 %

R₀ gepoolt :
TG : 242,24 mg
Koll. 2,85 %

Ü (s. unter A) :
TG : 39,11 mg
Koll. 78,76 %

Schritte zur Iso-
lierung v. Typ III

Rückstand R₂ lösen in
0,5 M Essigsäure u.
Dial. g. H₂O_{dest}

24 h lyophilisieren

5. Diskussion der Ergebnisse

5.1. Die Ergebnisse der Kollagenspaltung ohne Isolierung und getrennte Darstellung der Kollagentypen I und III in Abhängigkeit von den Entwicklungsperioden der Lunge

5.1.1. Die Untersuchungsergebnisse in der pseudoglandulären Periode der Lungenentwicklung

Es stehen 5 Proben zur Verfügung, die aufgrund ihrer geringen Ausgangsmenge und ihres vergleichbaren Hydroxyprolingehaltes gepoolt werden. Wie im Ergebnisprotokoll beschrieben, kann eine 1. Salzfällung erst bei 3 M Natriumchlorid erreicht werden. Die weitere Aufarbeitung verläuft unauffällig. Nach dem Lyophilisieren von R₀ zeigt sich eine ungenügende Trennung kollagener und nicht-kollagener Anteile. Dies ist mit einer geringen Rückgewinnung von Kollagen im Analysengang und einem hohen Anteil an Fremdproteinen verbunden, die in Elektrophorese und Densitometrie deutlich hervortreten. Es ist wahrscheinlich, daß wegen der hohen Spaltbarkeit der α -Ketten in dieser Entwicklungsperiode mehr Kollagen verloren geht als in späteren Entwicklungsstadien. Der Kollagengehalt des Ausgangsmaterials beträgt 3,28 %, der Kollagengehalt der gereinigten Probe nach CB-Spaltung beträgt 17,37 %. Sehr hoch ist der Gehalt des Restes nach Pepsin R₀ mit 64,12 %. Berechnet man die Anreicherung des Kollagens im gereinigten Material nach Cyanogenbromid-Spaltung in Prozent zur in diesen Schritt eingesetzten Menge, so erhält man einen Wert von 67,67 %.

5.1.2. Die Untersuchungsergebnisse in der kanalikulären Periode der Lungenentwicklung

Mit zunehmendem Gestationsalter kann die Menge Natriumchlorid, die zum Fällern des Kollagens im Überstand erforderlich ist, gesenkt werden. Während in der 19. Schwangerschaftswoche noch 2 M NaCl eingesetzt werden müssen, sind ab der 20. Schwanger-

schaftswoche nur 0,9 M erforderlich.

In dieser Gruppe zeigt sich auch die mit steigendem Gestationsalter zunehmende Trennbarkeit kollagener und nicht-kollagener Bestandteile im Verlauf der Analyse. So zeigt Probe 2[#] (19. SSW.) deutlich eine unvollständige Trennung des Kollagens vom Rückstand R₀ (vgl. Ergebnisprotokoll), während ältere Feten (20./21. SSW.) keine kollagenhaltigen Auflagerungen auf dem Lyophilisat von R₀ aufweisen.

Die Kollagenfraktionen der Cyanogenbromidspaltung zeigen in Abhängigkeit von der Schwangerschaftsdauer eine Trübung, die mit Abnahme des Fremdproteinanteils nachläßt und schließlich vollständig verschwindet. Die Trübung ist wohl durch diese Fremdproteine bedingt.

Elektrophoresen und Densitogramme zeigen eine deutliche Abnahme des Fremdproteinanteils in Probe 2[#] gegenüber Probe 1[#] sowie ein Fehlen desselben in allen weiteren Proben.

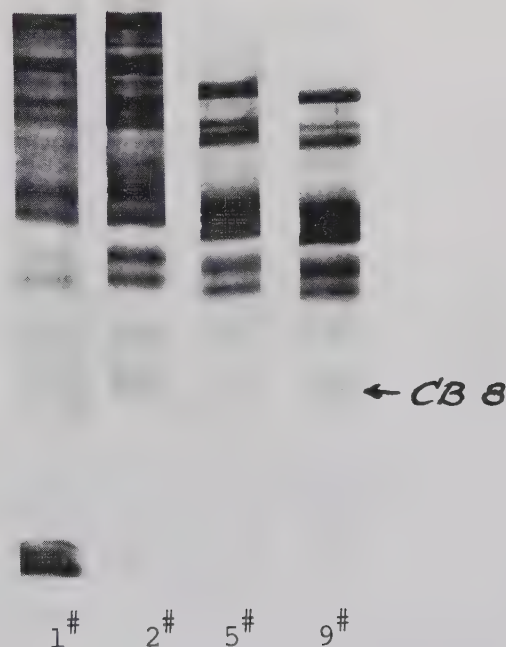


Abb. 18 Darstellung der Elektrophorese-Bandenmuster von 4 Proben, die zur Kollagenspaltung ohne getrennte Darstellbarkeit der Kollagentypen I und III der 14.-17. SSW (1[#]), 19. SSW (2[#]), 21. SSW (5[#]) und der 26. SSW (9[#]) eingesetzt werden, im Vergleich.

Besonders deutlich tritt als Maß für die Reinigung der Proben der zunehmende Kollagengehalt auf, d. h. die Extrahierbarkeit des Kollagens nimmt im Laufe der Aufarbeitung zu. Die folgende Tabelle zeigt die Ergebnisse nach verschiedenen Abschnitten der Analyse und gibt Auskunft über den Kollagengehalt in % sowie die Extrahierbarkeit des Kollagens in % der eingesetzten Menge nach der Cyanogenbromid-Spaltung.

Probe	SSW :	Kollagengehalt in % d. Ausgangsprobe	Kollagengehalt in % n. CB-Spaltung
2 [#]	19.	4,13	65,28
3 [#]	19.	4,37	86,36
4 [#]	20.	3,70	77,40
5 [#]	21.	5,42	85,45
6 [#]	21.	5,31	72,85
7 [#]	22./25.	4,02	88,95
8 [#]	24.	10,17	66,61

Tab. 20 Übersicht über den Kollagengehalt des Ausgangsmaterials und des Gewebes nach Cyanogenbromid-Spaltung in Prozent in der kanalikulären Periode der Lungenentwicklung.

Tabelle 21 zeigt die Extrahierbarkeit des Kollagens nach Cyanogenbromid-Spaltung in % der in diese Methode eingesetzten Menge Gewebe.

Probe	SSW :	Extrahierbarkeit in % nach CB-Spaltung
2 [#]	19.	92,81
3 [#]	19.	84,64
4 [#]	20.	74,77
5 [#]	21	85,02
6 [#]	21	82,47

Probe	SSW :	Extrahierbarkeit in % nach CB-Spaltung
7 [#]	22./25.	83,28
8 [#]	24.	97,93

Tab. 21 Übersicht über die Extrahierbarkeit des Kollagens in % der zur Cyanogenbromid-Spaltung eingesetzten Menge unter Berücksichtigung der Proben der kanalikulären Lungenentwicklungsperiode.

Beide Tabellen werden im Zusammenhang mit den anderen Proben grafisch darstellt.

Im Vergleich mit Probe 1[#] fällt der deutlich höhere Kollagengehalt der Proben nach Cyanogenbromid-Spaltung auf. Die Ursache dafür könnte die Ausbildung azinärer Strukturen, ein dünner werden des Bindegewebes zwischen den Azini und eine zunehmenden Vaskularisierung der Bronchioli alveolares sein. Während die pseudoglanduläre Periode der Lungenentwicklung durch dichotome Teilungen charakterisiert ist, die die Ausbildung broncho-pulmonaler Segmente bewirkt, wird die kanalikuläre Periode durch das Ausbilden der Azini geprägt. Bei der Präparation des Lungengewebes wurde besonders darauf geachtet, bronchiale Strukturen und Gefäße zu entfernen und primär Lungenparenchym vorliegen zu haben. Dies erklärt den großen Mengenunterschied, da in der pseudoglandulären Periode bronchiale Bestandteile überwiegen und die eigentliche Ausbildung von Parenchym erst in der kanalikulären Periode erfolgt. Zu dieser Zeit ist sogar ein geringer respiratorischer Gasaustausch möglich, da einige dünnwandige Sacculi alveolares bereits primitive Alveolen ausgebildet haben, die von Kapillarkörben umschlossen werden.

5.1.3. Die Untersuchungsergebnisse in der terminalen
Periode der Lungenentwicklung

In diese Gruppe fallen alle Proben von der 26. bis zur 40. Schwangerschaftswoche. Die Lungenentwicklung ist zu dieser Zeit soweit abgeschlossen, daß keine Teilungen der Bronchioli terminales mehr erfolgen. Die Bindegewebssepten zwischen den Sacculi alveolares werden zunehmend dünner. Es kommt zu einer Annäherung der Kapillaren an das Oberflächenepithel, zu einer Abflachung des isoprismatischen Epithels und zur Differenzierung der Pneumozyten Typ I und Typ II. Diese Periode ist nicht durch Lungenwachstum bzw. die Produktion von weiteren Teilungsgenerationen der Bronchien charakterisiert, sondern durch eine zunehmende Vaskularisierung. Diese Verhältnisse erklären die Ergebnisse der Anreicherung von Kollagen und seine Extrahierbarkeit.

Die folgende Tabelle zeigt einen relativ konstanten Kollagengehalt in % nach Cyanogenbromid-Spaltung. Deutlich erkennbar ist die vollständige Trennung von kollagenen und nicht-kollagenen Bestandteilen nach dem Lyophilisieren von R₀.

Probe	SSW :	Kollagengehalt in % d. Ausgangsprobe	Kollagengehalt in % n. CB-Spaltung
9 [#]	26.	7,31	86,38
10 [#]	27.	10,67	96,30
11 [#]	27.	9,27	83,93
12 [#]	27.+ 4 Lm	10,73	103,29
13 [#]	28./29.	7,13	90,26
14 [#]	37.	7,78	75,20
15 [#]	Termin	8,74	97,55

Tab. 22 Übersicht über den Kollagengehalt des Ausgangsmaterials und des Gewebes nach Cyanogenbromid-Spaltung in Prozent in der terminalen Periode der Lungenentwicklung.

Über die Extrahierbarkeit des Kollagens in % nach Cyanogenbromid-Spaltung in Abhängigkeit der eingesetzten Menge gibt die nachfolgende Tabelle Auskunft.

Probe	SSW :	Extrahierbarkeit in % nach CB-Spaltung
9 [#]	26.	70,42
10 [#]	27.	76,70
11 [#]	27.	83,32
12 [#]	27.+ 4 Lm	80,13
13 [#]	28./29.	72,43
14 [#]	37.	77,36
15 [#]	Termin	82,60

Tab. 23 Übersicht über die Extrahierbarkeit des Kollagens in % der zur Cyanogenbromid-Spaltung eingesetzten Menge unter Berücksichtigung der Proben der terminalen Lungenentwicklungsperiode.

Beide Tabellen werden grafisch dargestellt.

5.1.4. Die Untersuchungsergebnisse in der alveolären Periode der Lungenentwicklung

Es werden 2 Proben von jungen Säuglingen berücksichtigt. Wie erwartet zeigt sich eine gute Trennung kollagener und nicht-kollagener Bestandteile. Die Anreicherung der Probe, d.h. der nachweisbare Kollagengehalt in % nach Cyanogenbromid-Spaltung nimmt gegenüber den Proben der terminalen Periode nicht zu. Die gewonnenen Ergebnisse werden in Tabellen aufgeführt und anschließend grafisch im Zusammenhang mit den anderen Proben dargestellt.

Probe	Alter	Kollagengehalt in % d. Ausgangsprobe	Kollagengehalt in % n. CB-Spaltung
16 [#]	2. Im.	10,16	95,64
17 [#]	4. Im.	18,85	93,25

Tab. 24 Übersicht über den Kollagengehalt des Ausgangsmaterials und des Gewebes nach Cyanogenbromid-Spaltung in Prozent in der alveolären Periode der Lungenentwicklung.

Probe	Alter	Extrahierbarkeit in % nach CB-Spaltung
16 [#]	2. Im.	73,93
17 [#]	4. Im.	74,88

Tab. 25 Übersicht über die Extrahierbarkeit des Kollagens in % der zur Cyanogenbromid-Spaltung eingesetzten Menge unter Berücksichtigung der Proben der alveolären Periode der Lungenentwicklung.

5.1.5. Vergleichende Darstellung der Ergebnisse, Elektro-
phoresen und Densitogramme in Abhängigkeit vom
Gestationsalter

Die in den Abschnitten 5.1.1. - 5.1.4. aufgeführten Tabellen werden zur besseren Übersicht noch einmal im Zusammenhang dargestellt. Dabei möchte ich mich auf den Kollagengehalt der Proben nach Cyanogenbromid-Spaltung und auf die Darstellung der Extrahierbarkeit des Kollagens nach CB in % der für diese Methode eingesetzten Menge beschränken.

Probe	SSW :	Kollagengehalt in % n. CB-Spaltung	Extrahierbarkeit in % nach CB-Spaltung
1 [#]	14.-17.	17,37	67,67
2 [#]	19.	65,28	92,81
3 [#]	19.	86,36	84,64
4 [#]	20.	77,40	74,77
5 [#]	21.	85,45	85,02
6 [#]	21.	72,85	82,47
7 [#]	22./25.	88,95	83,28
8 [#]	24.	66,61	97,93
9 [#]	26.	86,38	70,42
10 [#]	27.	96,30	76,70
11 [#]	27.	83,93	83,32
12 [#]	27.+ 4 Lm	103,29	80,13
13 [#]	28./29.	90,26	72,43
14 [#]	37.	75,20	77,36
15 [#]	Termin	97,55	82,60
16 [#]	2. Lm.	95,64	73,93
17 [#]	4. Lm.	93,25	74,88

Tab. 26 Zusammenfassung der Tabellen 20 - 25. Übersicht über Kollagengehalt und Extrahierbarkeit nach Cyanogenbromid-Spaltung in Abhängigkeit des Gestationsalters.

Die Tabelle zeigt deutlich einen Anstieg des Kollagengehaltes mit zunehmendem Gestationsalter. Die Ergebnisse lassen sich grafisch darstellen (Abb. 18) und folgen der Funktion

$$f_{(x)} = - \frac{40 \times 0,9}{(x - 12)^{1,7}} + 95$$

Die Kurve nähert sich asymptotisch 95. Die Funktion ist aber erst ab der 14. SSW anzuwenden. Für jüngere Gestationsalter kann wegen fehlender Ergebnisse bei nicht vorliegendem Material keine Funktion erstellt werden. Da dieser Graph aus den im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Laborparameter abge-

leitet wird, muß weiteren Arbeiten mit einer wesentlich größeren Menge zur Verfügung stehenden Materials die Beweisführung überlassen werden.

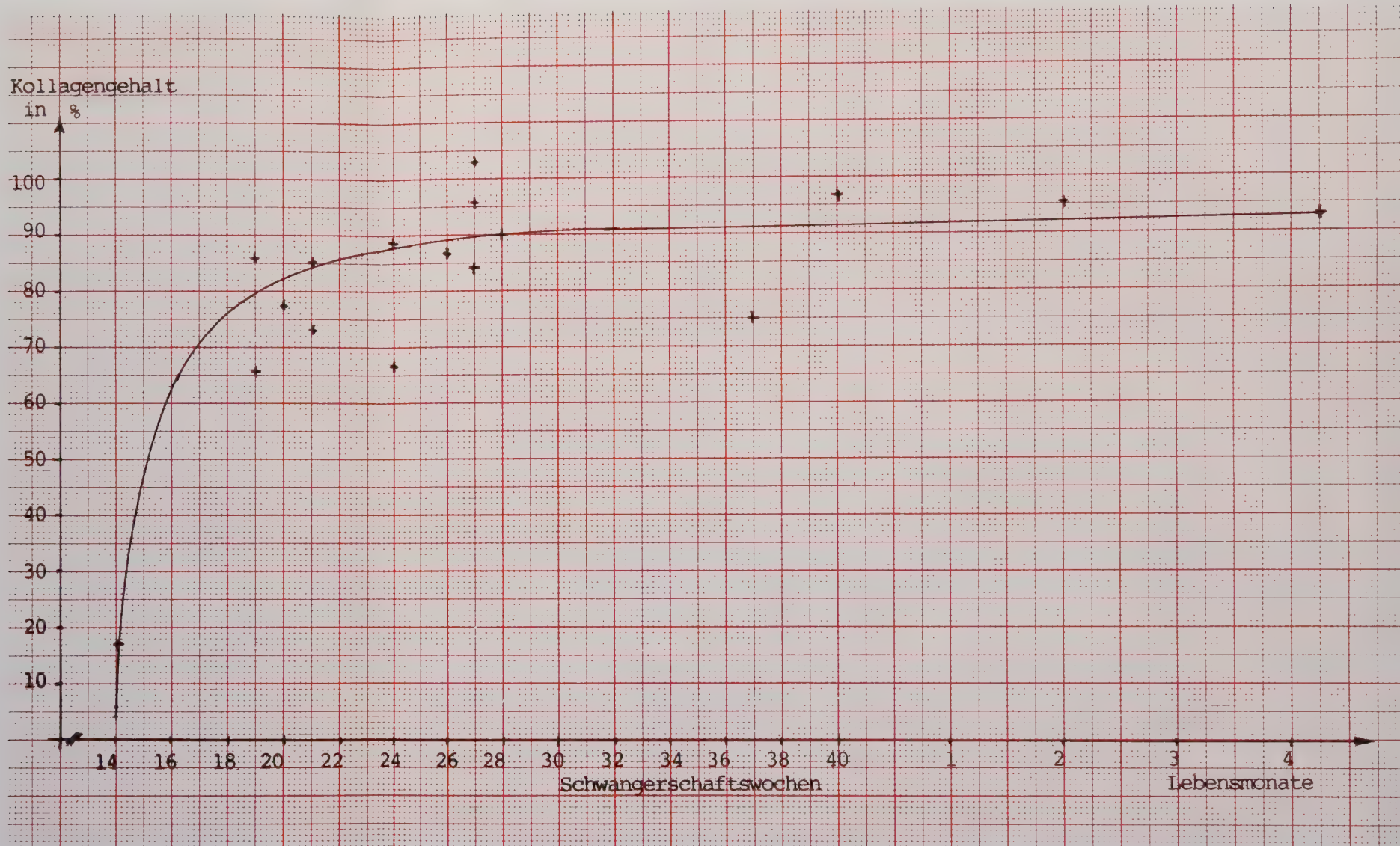


Abb. 19 Kollagengehalt der zur Kollagenspaltung ohne getrennte Darstellbarkeit der Kollagentypen I und III eingesetzten Proben nach Cyanogenbromid-Spaltung.

Legende :

+ Kollagengehalt der Proben_{0,9}
 — Funktion $f(x) = \frac{-40x}{(x-12)^{1,7}} + 95$

Deutlich erkennbar fallen einige Proben heraus. Sie zeigen auch im Verlauf der Analyse abweichende Ergebnisse. Im folgenden wird auf diese Proben einzeln eingegangen.

Probe 8[#] :

Diese Probe zeigt ein Analysenverhalten, das eher dem eines jüngeren Gestationsalters entsprechen würde (unvollständige Trennung kollagener und nicht-kollagener Anteile, Trübung der Kollagenfraktionen in der Cyanogenbromid-Spaltung). Der Kollagengehalt des Ausgangsmaterials liegt jedoch deutlich über dem vergleichbarer Proben.

Wie in Abbildung 18 erkennbar, liegt der Kollagengehalt nach Cyanogenbromid-Spaltung signifikant unter dem erwarteten Wert gemäß der berechneten Funktion $f_{(x)}$.

Die Extrahierbarkeit des Kollagens in % der zur Cyanogenbromid-Spaltung eingesetzten Menge liegt erheblich über den Werten von Proben vergleichbarer Schwangerschaftsdauer.

Probe 10[#] :

Diese Probe zeigt einen signifikant erhöhten Kollagengehalt des Ausgangsmaterials im Vergleich mit Proben entsprechenden Gestationsalters. Bei der Aufarbeitung des Materials treten die im Protokoll (s. Pg. 85) beschriebenen Abweichungen vom üblichen Verhalten auf.

Aus Tabelle 26 und Abbildung 18 ist zu entnehmen, daß der Kollagengehalt nach Cyanogenbromid-Spaltung gegenüber der Funktion und den Werten vergleichbarer Proben erhöht ist.

Im Bereich der anderen Ergebnisse liegt die Extrahierbarkeit des Kollagens in % der zur CB-Spaltung eingesetzten Menge.

Probe 12[#] :

Diese Probe ist nur schwer einzugliedern, da es sich um eine Frühgeburt der 27. SSW. handelt, die unter Beatmungstherapie 4 Monate lebte. Die Sektion zeigte erhebliche Lungenveränderungen.

Der Ausgangswert des Kollagengehaltes liegt sehr hoch, die Aufarbeitung des Materials zeigt Abweichungen, die dem Ergebnisteil (s. Pg. 89) zu entnehmen sind. Die Kollagenfraktionen 4 und 5 nach Cyanogenbromid-Spaltung sind klar, jedoch braun verfärbt.

Wie aus Abbildung 18 zu entnehmen ist, liegt der Kollagengehalt nach Reinigung des Materials und CB-Spaltung über der erstellten Funktion.

Die Extrahierbarkeit zeigt keine Auffälligkeiten.

Beim Vorbereiten der Proben für die Elektrophoresen zeigt sich eine extreme Empfindlichkeit des Lungenkollagens gegenüber Hitze. Das Gewebe darf nur maximal zweimal für die Darstellung der Kollagentypen in der Elektrophorese aufgekocht werden, da das Gewebe sonst denaturiert und sich keine charakteristischen Bandenmuster nachweisen lassen.

Die vergleichende Darstellung der Elektrophoresen verdeutlicht Abweichungen im Bandenmuster durch die direkte Gegenüberstellung.

Die Proben 1[#] und 2[#] zeigen eine deutliche Vernetzung des Kollagens und lassen eine schlechtere Trennung der CB-Banden erkennen. Besonders auffällig ist der hohe Anteil an Fremdprotein in Probe 1[#]. Die Proben älteren Gestationsalters lassen eine bessere Darstellung der CB-Banden erkennen. Besonders auf die für Typ III-Kollagen charakteristische CB 8 - Bande wird geachtet. Die vergleichende Anordnung zeigt deutlich die zunehmende Anfärbbarkeit dieser Bande mit zunehmendem Gestationsalter. Bei der Anordnung wird sie als Bezugspunkt verwendet, wie auch bei der folgenden Anordnung der Densitogramme.

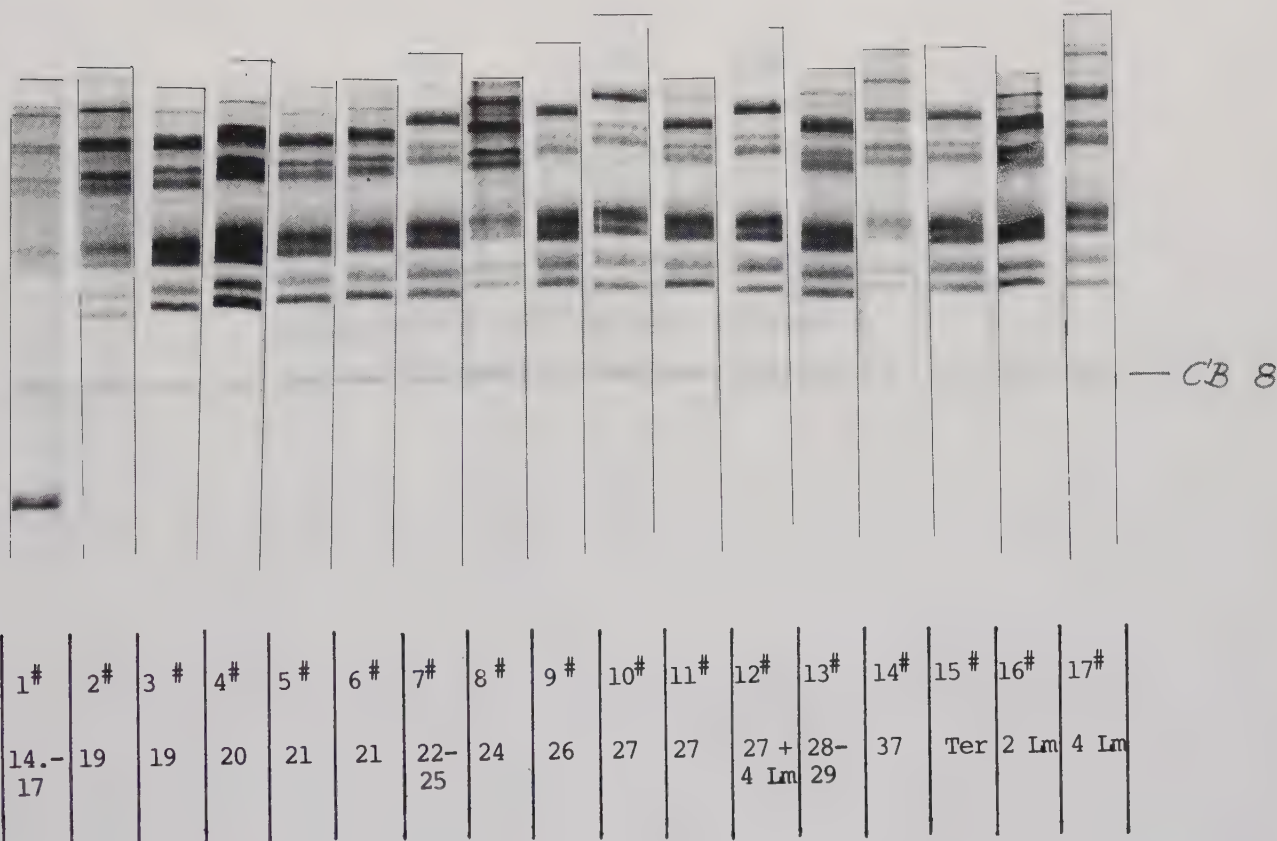


Abb. 20 Anordnung der Elektrophorese-Cyanogenbromid-Bandenmuster in Abhängigkeit vom Gestationsalter der zur Kollagenspaltung ohne getrennte Darstellbarkeit der Typen I und III eingesetzten Proben.

10#
27. SSW

11#
27. SSW

12#
27. SSW + 4LM

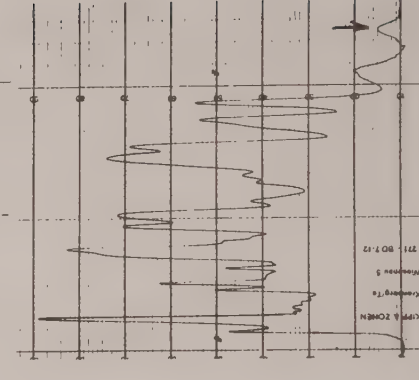
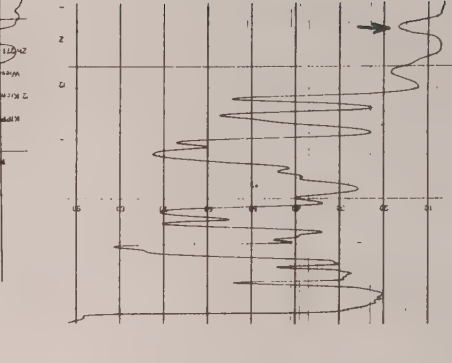
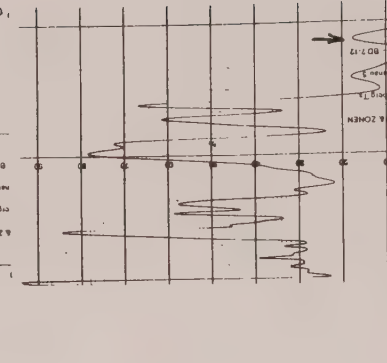
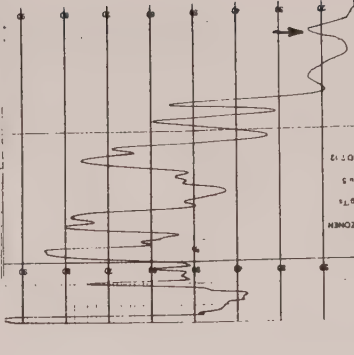
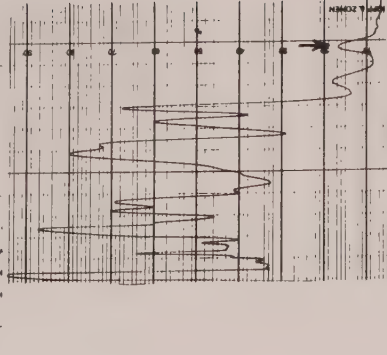
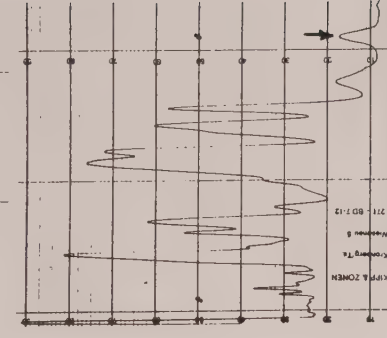
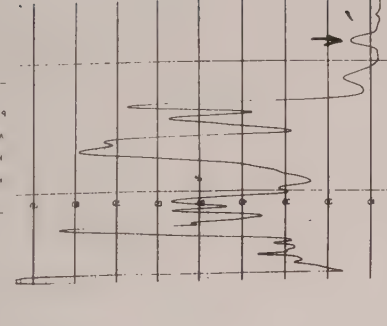
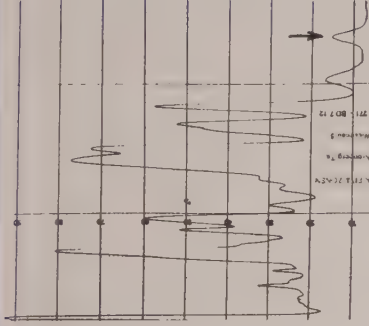
13#
28-29. SSW

14#
37. SSW

15#
TERMIN

16#
2. LM.

17#
4. LM.



Die Anordnung der Densitogramme ermöglicht die bessere Beurteilung abweichender Peaks durch den direkten Vergleich.

Bei Probe 1[#] wird deutlich, daß der hohe Anteil an Fremdprotein die Darstellung einer möglicherweise vorhandenen CB 8 - Bande verdeckt. Bei der folgenden Probe 2[#] läßt sich ein kleiner Peak als Ausdruck von CB 8 nachweisen.

Probe 8[#] zeigt ein verändertes Bild. Die CB 8 - Bande weist nur einen geringen Peak auf, was, wie die schon beschriebenen Ergebnisse dieser Probe, eher auf ein jüngeres Gestationsalter schließen läßt.

Die Proben 10[#] und 12[#], die durch ein verändertes Verhalten bei der Aufarbeitung auffallen, zeigen im Densitogramm Abweichungen im charakteristischen Muster, die durch Pfeile markiert sind.

Probe 14[#] weist ebenfalls ein verändertes Muster auf.

Probe 16[#], die bei der Analyse keine Veränderungen zeigt, läßt jedoch Abweichungen im Densitogramm erkennen.

Auch die bis auf einen extrem erhöhten Kollagengehalt im Ausgangsmaterial unauffällige Probe 17[#] zeigt Veränderungen, die mit Pfeilen markiert werden.

5.2. Die Ergebnisse der Kollagenspaltung und Isolierung der Kollagentypen I und III in Abhängigkeit von den Entwicklungsperioden der Lunge

Wie beschrieben können nur Proben berücksichtigt werden, die einem höheren Gestationsalter entsprechen, da relativ große Materialmengen benötigt werden. So stehen für die pseudoglanduläre Periode kein und für die kanalikuläre Periode nur ein Gewebe (25. SSW.) zur Verfügung.

5.2.1. Das Untersuchungsergebnis in der kanalikulären
Periode der Lungenentwicklung

Diese Probe hat bei der Isolierung der Kollagentypen I und III der Haut ein verändertes Trennungsverhalten gezeigt (76). Bei der Aufarbeitung des Lungengewebes treten ebenfalls Abweichungen auf. Der Kollagengehalt des Ausgangsmaterials liegt im Bereich vergleichbarer Schwangerschaftswochen.

Die Probe ergibt 2 Fraktionen, die durch eine große Menge R_1 neben dem Überstand gebildet werden. Beide Fraktionen werden als Probe A und B weiter aufgearbeitet.

Der Kollagengehalt von Probe $1^* B$ (von R_1) zeigt für die Kollagentypen I und III extrem niedrige Werte, so daß eine gelungene Isolierung der genannten Kollagentypen fraglich erscheint.

Nach dem Lyophilisieren findet man eine sehr geringe Menge des fraglichen Typ I ($[\alpha 1(I)]_2 \propto 2$), der nicht mehr in Cyanogenbromid-Spaltung und anschließende Elektrophorese eingesetzt werden kann. Der fragliche Typ III ($[\alpha 1(III)]_3$) zeigt auch nach CB-Spaltung einen relativ geringen Kollagengehalt. Elektrophorese und Densitometrie lassen ein signifikant verändertes Muster erkennen und ein Beweis der Isolierung dieses Kollagentypes kann nicht erbracht werden.

Die Isolierung der Kollagentypen I und III in Probe $1^* A$ erscheint zunächst besser gelungen zu sein, da der Kollagengehalt der isolierten, fraglichen Typen in der erwarteten Höhe liegt. Elektrophorese und Densitometrie können diese Typen jedoch nicht nachweisen. Man findet stark veränderte Bandenmuster.

Wie bei der Untersuchung der Haut von Frau EWERT (76) kann auch bei der Lunge keine Isolierung normaler Kollagentypen I und III erreicht werden.

Die Mengenrelation zwischen Typ III und Typ I $\frac{[\alpha 1(III)]_3}{[\alpha 1(I)]_2 \propto 2}$ ist zugunsten von Typ III verschoben.

Genaue Angaben finden sich in einer Tabelle im Vergleich mit anderen Proben.

Probe	SSW :	Kollagengeh. % Ausgangspr.	Kollagengeh.% Typ I nach CB-Spaltung	Kollagengeh.% Typ III nach CB-Spaltung
1* A	25.	5,40	88,28	78,74
B	25.	5,40	---	63,30

Tab. 27 Übersicht über den Kollagengehalt des Ausgangsmaterials und des Gewebes nach Cyanogenbromid-Spaltung in % für die isolierten Kollagentypen I und III in der kanalikulären Periode.

Probe	SSW :	Extrahierbarkeit in % n. CB-Spal- tung f. Typ I	Extrahierbarkeit in % n. CB-Spal- tung f. Typ III
1* A	25.	65,67	74,94
B	25.	---	77,15

Tab. 28 Übersicht über die Extrahierbarkeit des Kollagens in % der zur Cyanogenbromid-Spaltung eingesetzten Menge unter Berücksichtigung der isolierten Kollagentypen I und III in der kanalikulären Periode der Lungenentwicklung.

5.2.2. Die Untersuchungsergebnisse in der terminalen Periode der Lungenentwicklung

In diese Gruppe fallen sechs Proben von der 26. Schwangerschaftswoche bis zum Termin. Obwohl einige Feten erhebliche Mißbildungen aufweisen, zeigt das Verhalten während der Analyse keine Abweichungen vom erwarteten Verlauf. Die folgende Tabelle gibt Auskunft über den Kollagengehalt in % des Ausgangsmaterials sowie über die Anreicherung des Kollagens in den Kollagentypen I und III.

Probe	SSW :	Kollagengeh. % Ausgangspr.	Kollagengeh.% Typ I nach CB-Spaltung	Kollagengeh.% Typ III nach CB-Spaltung
2 [*]	26.	13,13	86,97	83,18
3 [*]	26.	11,80	103,61	98,53
4 [*]	29./32.	6,02	93,91	88,51
5 [*]	37.	8,21	92,84	80,67
6 [*]	37.	6,14	88,41	105,21
7 [*]	Termin	8,66	87,03	98,53

Tab. 29 Übersicht über den Kollagengehalt des Ausgangsmaterials und des Gewebes nach Cyanogenbromid-Spaltung in % für die isolierten Kollagentypen I und III in der terminalen Periode.

Probe	SSW :	Extrahierbarkeit in % n. CB-Spal- tung f. Typ I	Extrahierbarkeit in % n. CB-Spal- tung f. Typ III
2 [*]	26.	66,54	61,96
3 [*]	26.	96,33	94,13
4 [*]	29./32.	94,05	82,37
5 [*]	37.	74,31	68,60
6 [*]	37	73,99	77,46
7 [*]	Termin	83,53	85,30

Tab. 30 Übersicht über die Extrahierbarkeit des Kollagens in % der zur Cyanogenbromid-Spaltung eingesetzten Menge unter Berücksichtigung der isolierten Kollagentypen I und III in der terminalen Periode der Lungenentwicklung.

Die Relation der Menge $[\alpha 1(\text{III})]_3 : [\alpha 1(\text{I})]_2 \approx 2$, die nach der Aufarbeitung des Materials isoliert werden kann, wird in einer Übersicht tabellarisch zusammengefaßt und im Zusammenhang mit den anderen Ergebnissen grafisch dargestellt.

5.2.3. Die Untersuchungsergebnisse in der alveolären
Periode der Lungenentwicklung

Es werden drei Proben berücksichtigt, die sich in der alveolären Periode der Lungenentwicklung befinden. Dabei treten bei zwei Proben bei der Aufarbeitung des Materials Abweichungen im Analysengang auf. Die folgenden Tabellen fassen die Ergebnisse der Anreicherung des Kollagengehaltes nach Cyanogenbromid-Spaltung sowie die Extrahierbarkeit des Kollagens in % zur in die CB-Spaltung eingesetzten Menge zusammen. Eine Übersicht über die Mengenrelation von Typ III : Typ I - Kollagen wird im Zusammenhang mit den anderen Proben aufgeführt und grafisch dargestellt.

Probe	Alter	Kollagengeh. % Ausgangspr.	Kollagengeh.% Typ I nach CB-Spaltung	Kollagengeh.% Typ III nach CB-Spaltung
8*	Termin	11,33	95,80	95,81
9* A	2. Im.	10,16	96,54	90,03
B	2. Im.	10,16	---	85,26
10* A	3. Im +	7,13	93,25	90,20
B	3 Wo.	7,13	---	108,51

Tab. 31 Übersicht über den Kollagengehalt des Ausgangsmaterials und des Gewebes nach Cyanogenbromid-Spaltung in % für die isolierten Kollagentypen I und III in der alveolären Periode.

Probe	Alter	Extrahierbarkeit in % n. CB-Spal- tung f. Typ I	Extrahierbarkeit in % n. CB-Spal- tung f. Typ III
8*	Termin	80,36	83,37
9* A	2. Lm.	86,86	74,40
B	2. Lm.	---	49,52
10* A	3. Lm. +	86,60	79,09
B	3 Wo.	---	85,08

Tab. 32 Übersicht über die Extrahierbarkeit des Kollagens in % der zur Cyanogenbromid-Spaltung eingesetzten Menge unter Berücksichtigung der isolierten Kollagentypen I und III in der alveolären Periode der Lungenentwicklung

5.2.4. Vergleichende Darstellung der Ergebnisse, Elektrophoresen und Densitogramme in Abhängigkeit vom Gestationsalter

Die in den Abschnitten 5.2.1. - 5.2.3. aufgeführten Tabellen werden zur besseren Übersicht noch einmal zusammengefaßt. Es ist zu erkennen, daß der Kollagengehalt für beide Typen leicht ansteigt und sich gemäß der Funktion

$$f_{(x)} = - \frac{40 \cdot x^{0,9}}{(x - 12)^{1,7}} + 95$$

asymptotisch + 95 nähert. Die in Abschnitt 5.1.5 gemachten Einschränkungen für die Gültigkeit dieser Funktion müssen auch hier berücksichtigt werden.

Damit entspricht das Ergebnis den für die Kollagenspaltung ohne die Möglichkeit der getrennten Darstellung der Kollagentypen $[\alpha 1(I)]_2 \propto 2$ und $[\alpha 1(III)]_3$ gewonnenen Angaben.

Die folgende Graphik veranschaulicht die Parameter der Tabelle.

Probe	SSW :	Kollagengehalt in % n. CB-Spaltung		Extrahierbarkeit in % n. CB-Spaltung	
		Typ I	Typ III	Typ I	Typ III
1 [*] A	25.	88,28	78,74	65,67	74,94
B	25.	---	63,30	---	77,15
2 [*]	26.	86,97	83,18	66,54	61,96
3 [*]	26.	103,61	98,53	96,33	94,13
4 [*]	29./32.	93,91	88,51	94,05	82,37
5 [*]	37.	92,84	80,67	74,31	68,60
6 [*]	37	88,41	105,21	73,99	77,46
7 [*]	Termin	87,03	98,53	83,53	85,30
8 [*]	Termin	95,80	95,81	80,36	83,37
9 [*] A	2. Im.	96,54	90,03	86,86	74,40
B	2. Im.	---	85,26	---	49,52
10 [*] A	3. Im.	93,25	90,20	86,60	79,09
	+ 3 Wo.	---	108,51	---	85,08

Tab. 33 Zusammenfassung der Tabellen 27 - 32. Übersicht über Kollagengehalt und Extrahierbarkeit nach Cyanogenbromid-Spaltung unter Berücksichtigung der Kollagentypen I und III in Abhängigkeit des Gestationsalters.

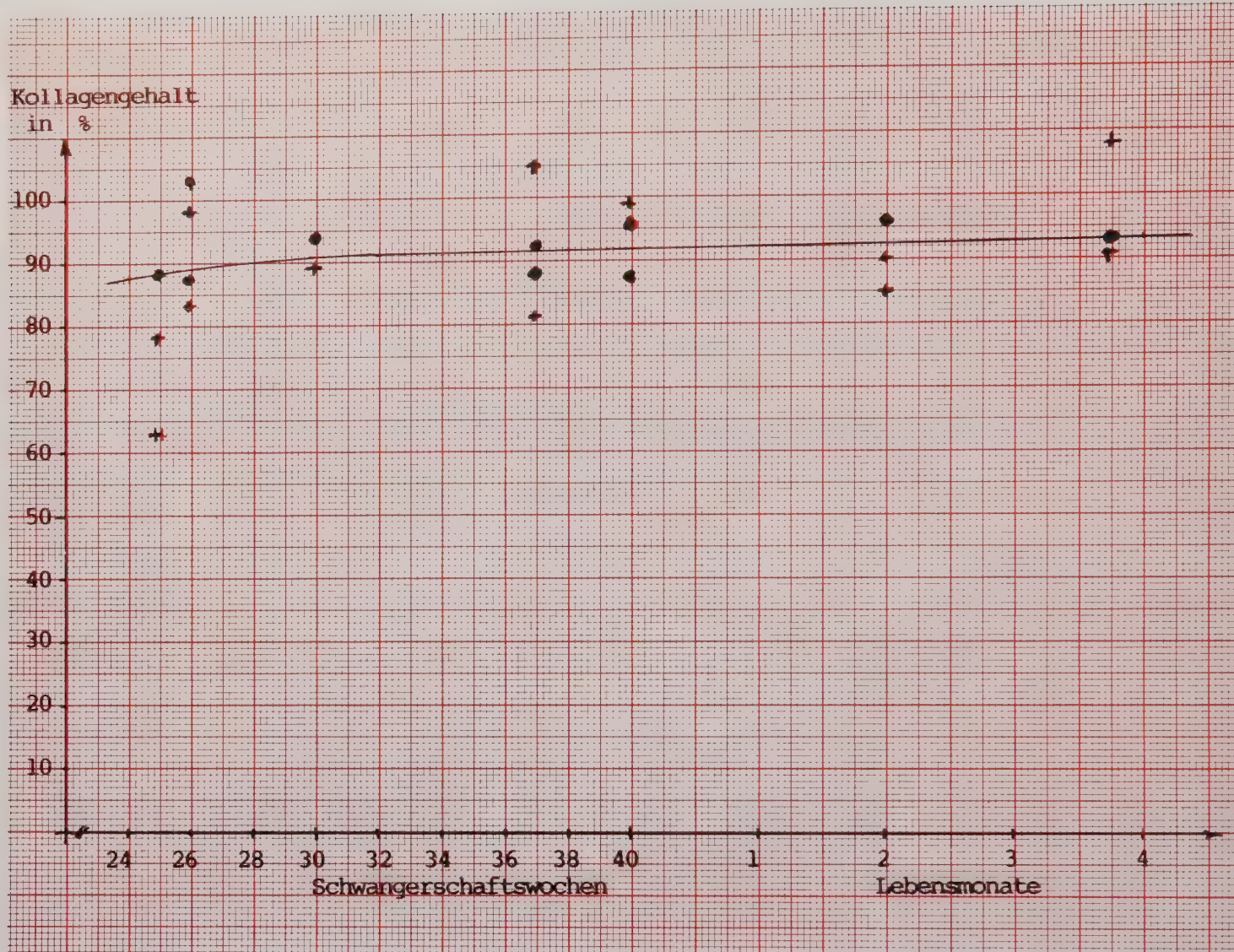


Abb. 22 Kollagengehalt in % der zur Isolierung der Kollagentypen I und III eingesetzten Proben nach Cyanogenbromidsplaltung in Abhängigkeit vom Gestationsalter

Legende :



Typ I-Kollagen



Typ III-Kollagen



$$\text{Funktion } f(x) = \frac{-40 \times 0,9}{(x - 12) 1,7} + 95$$

Die Mengenrelation zwischen Typ III und Typ I-Kollagen ($[\alpha 1(\text{III})]_3 : [\alpha 1(\text{I})]_2 \propto 2$) liegt für die meisten Proben im Bereich um 1. Wie Tabelle und Graphik zeigen, fallen einige Proben heraus, die auch ein verändertes Trennungsverhalten zeigen. Auf sie wird im Anschluß einzeln eingegangen.

Probe	SSW :	Mengenrelation $\frac{[\alpha 1(\text{III})]_3}{[\alpha 1(\text{I})]_2 \propto 2}$
1 [*] A	25.	1,53
B	25.	12,06
2 [*]	26.	0,86
3 [*]	26.	1,12
4 [*]	29./32.	2,46
5 [*]	37.	1,13
6 [*]	37.	0,82
7 [*]	Termin	1,49
8 [*]	Termin	1,84
9 [*] A	2. Im.	1,03
B	2. Im.	3,36
10 [*] A	3. Im.	0,56
B	+ 3 Wo.	20,43

Tab. 34 Tabellarische Übersicht über die Mengenrelation Typ III : Typ I in Abhängigkeit des Gestationsalters.

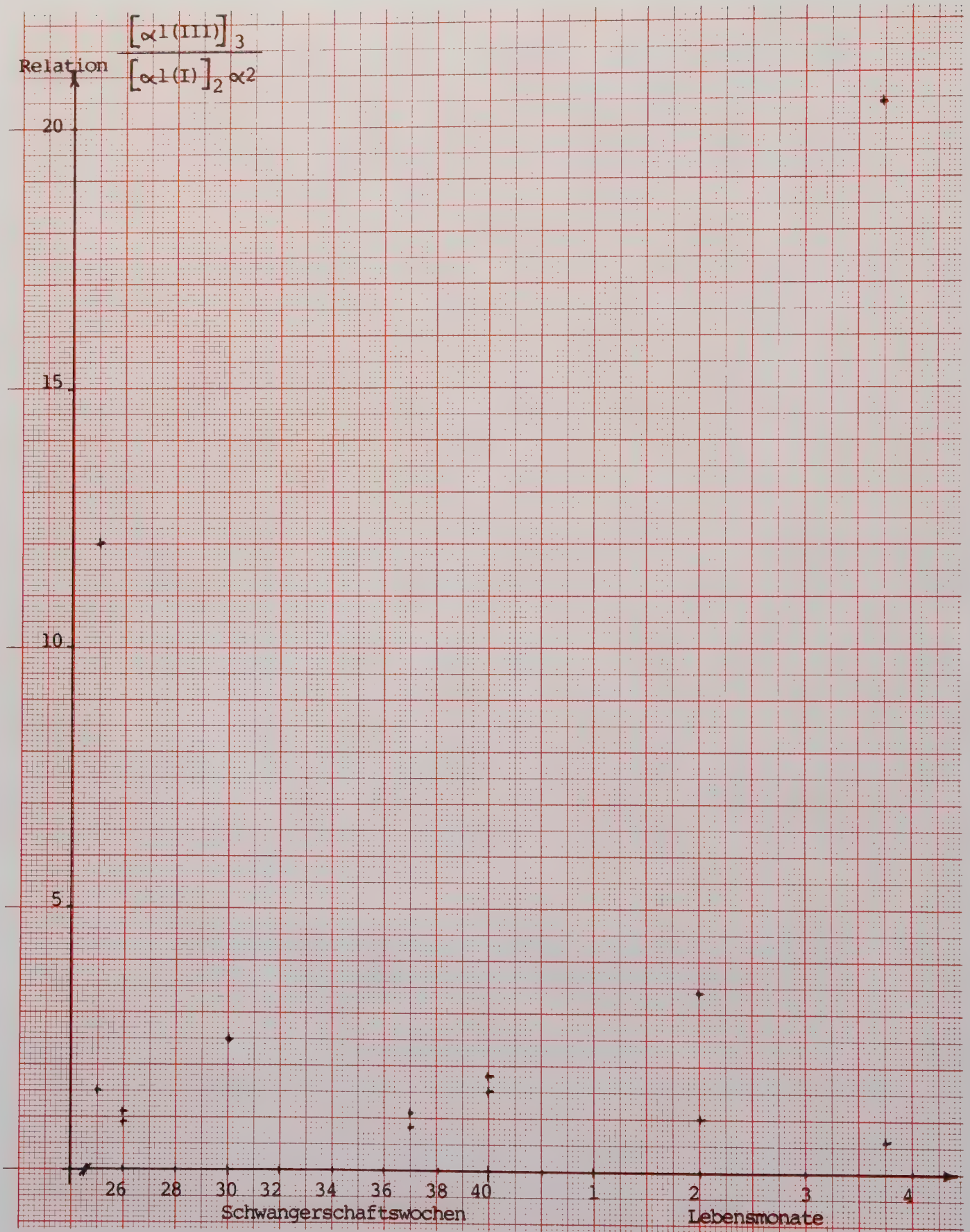


Abb. 23 Graphische Darstellung der Mengenrelation von den Kollagentypen III : I in Abhängigkeit des Gestationsalters

Probe 1^{*} :

Da die Ergebnisse dieser Probe schon beschrieben wurden, wird sich auf eine kurze Darstellung beschränkt.

Die große Menge von R_1 , die weiter verarbeitet wird, erfordert die Unterteilung der Probe in A und B. Es können nur fragliche Kollagentypen I und III mit einer verschobenen Mengenrelation $[\alpha 1(III)]_3 : [\alpha 1(I)]_2 \alpha 2$ isoliert werden. Elektrophorese und Densitometrie zeigen uncharakteristische Bandenmuster, die eine Zuordnung der isolierten Proben von A und B zu den Kollagentypen I und III nicht zulassen.

Probe 4^{*} :

Diese gepoolte Probe zeigt Atelektasen. Im Trennungsverhalten weicht sie gering von dem erwarteten Verhalten (vgl. Protokoll) ab.

Elektrophorese und Densitometrie weisen im Vergleich mit denen anderer Proben keine Abweichungen im Bandenmuster auf. Die Mengenrelation $[\alpha 1(III)]_3 : [\alpha 1(I)]_2 \alpha 2$ liegt deutlich über vergleichbaren Werten.

Probe 9^{*} :

Das Material dieser Probe wird zunächst zur Kollagenspaltung ohne Isolierung der Kollagentypen I und III (vgl. Probe 16[#]) eingesetzt. Bei dieser Untersuchung zeigen sich keine auffälligen Befunde.

Bei der Typenisolierung treten Abweichungen vom erwarteten Trennungsverhalten auf. Wegen einer hohen Menge des Restes R_1 wird dieser weiter verarbeitet. Beide werden wie in Probe 1^{*} mit A (vom Überstand) und B (von R_1) bezeichnet.

Probe A weist einen hohen Kollagengehalt der Typen I und III auf. Die Mengenrelation dieser Typen liegt im Bereich der anderen Ergebnisse.

Probe B hat einen wesentlich niedrigeren Kollagengehalt und eine verschobene Mengenrelation von $[\alpha 1(\text{III})]_3 : [\alpha 1(\text{I})]_2 \approx 2$ zugunsten von Typ III. Da die nach dem Lyophilisieren gewonnene Menge sehr gering ist, kann sie nicht zur Cyanogenbromid-Spaltung eingesetzt werden. So kann eine Elektrophorese des fraglichen Typ I-Kollagens der Probe B nicht durchgeführt werden.

Elektrophoresen und Densitometrien der anderen Anteile zeigen zwar geringe Veränderungen, die charakteristischen Bandenmuster von Typ I und III bei Probe A bzw. Typ III bei Probe B sind jedoch nachweisbar.

Probe 10^{*} :

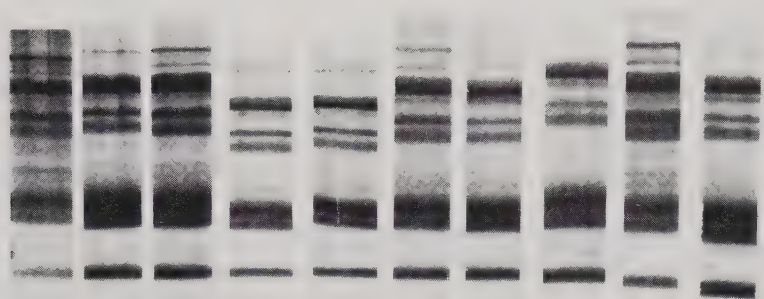
Der Kollagengehalt des Ausgangsmaterials liegt im Bereich vergleichbarer Alter. Die Aufarbeitung des Materials verläuft mit Veränderungen im Analysengang, die eine große Menge R_1 ergeben, so daß auch diese Probe in A und B unterteilt und beide Teile weiter aufgearbeitet werden.

Probe A zeigt einen erwarteten hohen Kollagengehalt der fraglichen Typen $[\alpha 1(\text{I})]_2 \approx 2$ und $[\alpha 1(\text{III})]_3$ und wird mit beiden in die Cyanogenbromid-Spaltung eingesetzt. Die Mengenrelation unter der der anderen Proben wie Tabelle und Graphik verdeutlichen.

Probe B weist beim fraglichen Kollagentyp I einen auffallend niedrigen Kollagengehalt auf. Es muß im Verlauf der Analyse eine erhebliche Materialmenge verloren gegangen sein oder es muß sich um einen atypischen Kollagentyp I handeln. Der fragliche Kollagentyp III dagegen hat einen hohen Kollagengehalt, der deutlich über dem der anderen Proben liegt. Damit verschiebt sich die Mengenrelation Typ III : Typ I stark und liegt signifikant über dem erwarteten Bereich.

Elektrophoresen und Densitogramme zeigen diskrete Abweichungen im Muster. Alle für die Kollagentypen I und III charakteristischen CB - Banden sind jedoch nachweisbar.

Die vergleichende Anordnung der Elektrophoresen von Typ I-Kollagen ermöglicht eine einfachere Beurteilung der einzelnen Proben. Deutlich veränderte Bandenmuster weisen die Proben 1*, 9* und 10* auf. Die Veränderungen sind mit Pfeilen markiert.

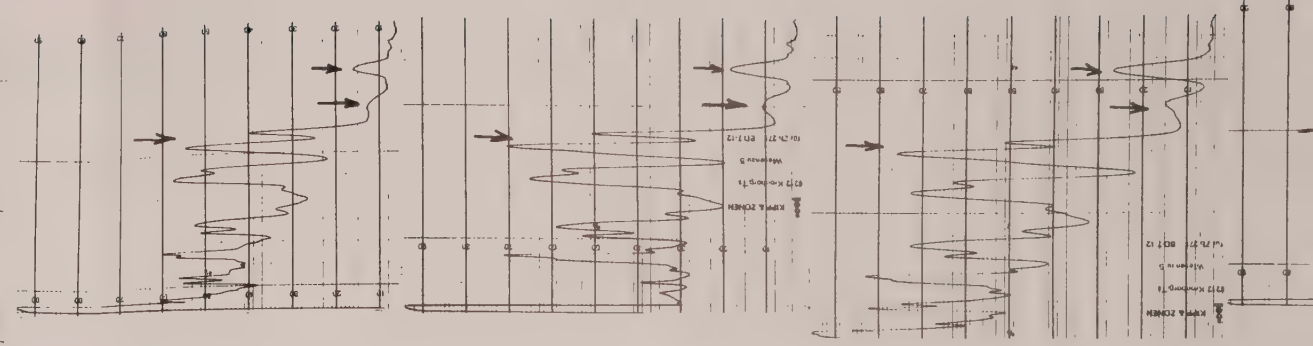
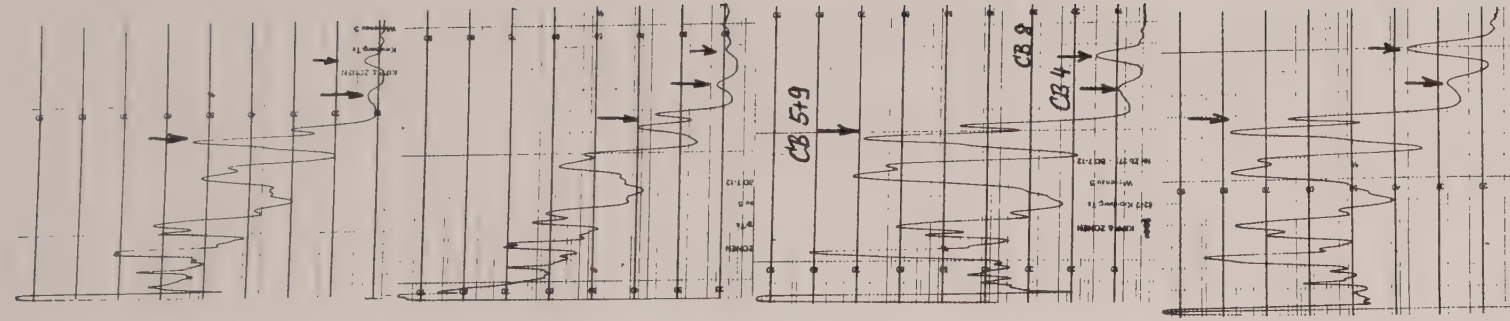


Proben - Nr.	1*	2*	3*	4*	5*	6*	7*	8*	9*	10*
SSW.	25	26	26	29	37	37	Ter.	Ter.	2 Im	3 Im + 3 W.

Abb. 24 Vergleichende Anordnung der Elektrophorese-Cyanogenbromid-Bandenmuster des Kollagentypes I in Abhängigkeit vom Gestationsalter.

Der Vergleich der Densitogramme entspricht den Elektrophoresen. Wie bei der Untersuchung der Haut von EWERT (76) zeigt Probe 1^{*} die deutlichsten Veränderungen. Eine Isolierung des Kollagentypes $[\alpha 1(I)]_2 \alpha 2$ scheint nicht gelungen. Bei Probe 9^{*} und 10^{*} kann Typ I-Kollagen identifiziert werden, obwohl im Densitogramm Veränderungen nachweisbar sind. Die Feten der Proben 2^{*} und 3^{*} zeigen neben erheblichen Mißbildungen eine unauffällige Lungenmorphologie. Dies erklärt die charakteristischen Bandenmuster und ermöglicht die Darstellung charakteristischer Typ I-Elektrophoresen und -Densitogramme.

Abb. 25 Vergleichende Anordnung der Densitogramme von
Typ I-Kollagen in Abhängigkeit des Gestations-
bzw. Lebensalters (s. S. 165)



2*
26. SSW

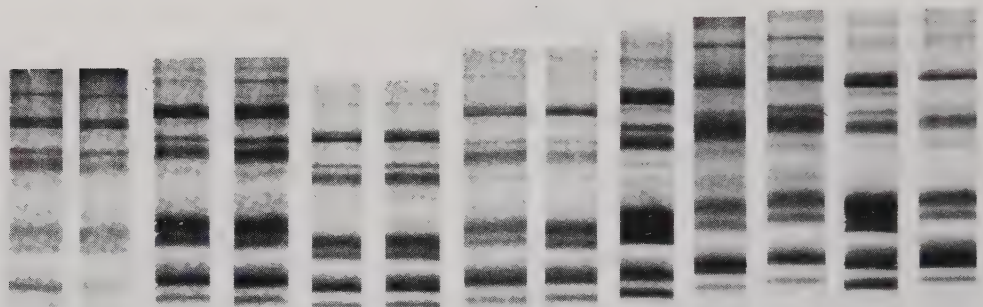
3*
26. SSW

4*
29. SSW

5*
37. SSW

6*
37. SSW

Die folgende Abbildung zeigt die Elektrophoresemuster des Kollagentypes $[\alpha 1(\text{III})]_3$ aller untersuchter Proben im direkten Vergleich. Es fällt auf, daß Probe 1* in beiden untersuchten Teilen A und B ein deutlich verändertes Muster zeigt. Typ III ist in beiden Fällen nicht sicher zu identifizieren. Die Proben 9* und 10* A und B dagegen zeigen nur diskrete Veränderungen, ermöglichen aber ein Charakterisieren des isolierten Kollagens als Typ $[\alpha 1(\text{III})]_3$.



Proben-Nr.	1*	1*	2*	3*	4*	5*	6*	7*	8*	9*	9*	10*	10*
	A	B								A	B	A	B
SSW.	25	25	26	26	29	37	37	Ter	Ter	2 Lm	2 Lm	3 lm + 3 W	3 Lm + 3 W

Abb. 26 Vergleichende Anordnung der Elektrophorese-Cyanogenbromid-Bandenmuster des Kollagentypes III in Abhängigkeit vom Gestationsalter.

Die Densitogramme unterstützen die vorher gemachten Aussagen. Probe 1^{*} A und B zeigt deutlich ein uncharakteristisches Bandenmuster. Typ III läßt sich - wie bei EWERT (76) - in keinem der beiden Teile eindeutig identifizieren.

Bei dem jungen Säugling im 2. Lebensmonat (Probe 9^{*}) erfolgt die Unterteilung in A und B im Rahmen der Analyse. Beide Fraktionen zeigen $[\alpha 1(\text{III})]_3$ - Kollagen, jedoch fallen diskrete Veränderungen im Muster auf.

Probe 10^{*} weist bei der Sektion des 3 Monate und 3 Wochen alten Säuglings eine unveränderte Lungenmorphologie auf. Dennoch treten die beschriebenen Veränderungen auf. Das als Probe A und B aufgearbeitete Gewebe läßt im Densitogramm Typ III-Kollagen erkennen. Auch hier fallen geringe Veränderungen im Muster auf. Die Darstellung im Densitogramm unterstützt die bisher gemachten Aussagen in bezug auf die Abweichungen im Trennungsverhalten und in der Mengenrelation.

Abb. 27 Vergleichende Anordnung der Densitogramme von
Typ III-Kollagen in Abhängigkeit vom Gestations-
bzw. Lebensalter (s. S. 168)

6. Zusammenfassung und abschließende Beurteilung

Die Anwendung von getrocknetem fetalen Lungengewebe bietet eine Reihe von Vorteilen bei der qualitativen und quantitativen Bestimmung der Kollagentypen I ($[\alpha 1(I)]_2 \alpha 2$) und III ($[\alpha 1(III)]_3$). Bei sachgemäßer Lagerung kann das Trockenmaterial beliebig lang aufbewahrt werden. Damit ergibt sich die Möglichkeit, Versuchsreihen zu planen und bei Artefakten oder pathologischen Ergebnissen zu wiederholen. Die Methode bietet durchaus reproduzierbare Ergebnisse.

Das fetale Lungengewebe unterliegt im Rahmen der Ontogenese verschiedene Entwicklungsperioden, denen histologische Korrelate zugeordnet werden können. Aus den Untersuchungen geht hervor, daß die endgültige Ausreifung der Lunge im wesentlichen abhängig ist von :

der Zunahme der Alveolarzellen und
der Volumenzunahme der Alveolen entsprechend dem
Thoraxwachstum.

Die Einteilung der Lungenentwicklungsperioden wird sich zur Gliederung der Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit zu Nutze gemacht.

Da sich nach KITTERMAN (137) das Lungenwachstum proportional zum Körperwachstum verhält, wird versucht, Fehler durch Entwicklungsretardierung der Feten zu vermeiden, in dem die klinischen Angaben anhand der Scheitel-Steiß-Länge in mm bzw. der Scheitel-Fersen-Länge in mm hinsichtlich des wahrscheinlichen Gestationsalters überprüft wird. Dabei kann auf eine Berücksichtigung des Geschlechtes verzichtet werden, da nach LUBCHENKO (167) keine signifikanten Größenunterschiede zwischen den Geschlechtern von der 26. bis zur 42. Schwangerschaftswoche nachweisbar sind. Aus den in der Literatur verstreuten Angaben wird eine Tabelle entwickelt, die eine Zuordnung jedes einzelnen Feten in jede Schwangerschaftswoche er-

möglichst. Die klinischen Angaben werden dem wahrscheinlichen, der Entwicklung eher entsprechenden Gestationsalter angepaßt.

Die Bestimmung des Kollagengehaltes des Ausgangsmaterials erfolgt über die Messung des Hydroxyprolingehaltes nach Erstellen einer Eichkurve, die im linearen Bereich bis 5 µg Hydroxyprolin die Funktion

$$f_{(x)} = 0,08 \times$$

aufweist.

Mit zunehmendem Lungenwachstum bzw. mit zunehmender Lungenreife beobachtet man einen Anstieg des Gesamtkollagengehaltes in Abhängigkeit vom Gestationsalter. Durch Berechnung der Mittelwerte ($\bar{x}$) der einzelnen Lungenentwicklungsperioden läßt sich eine Kurve ableiten, die im Sinne einer e-Funktion verläuft. Genaue Angaben zur Funktion können im Rahmen dieser Arbeit nicht gemacht werden und müssen durch umfangreichere, weiterführende Arbeiten bestimmt werden.

Bei veränderter Lungenmorphologie (z.B. entzündlichen Veränderungen) tritt ein Anstieg des Kollagengehaltes auf, der signifikant über dem vergleichbarer Gestationsalter liegt. Mögliche Ursachen sind :

vermehrte Kollagenbiosynthese im Sinne eines Kompensations- oder Reparationsversuches,

höhere Spaltbarkeit der Kollagenketten und damit Zunahme des nachweisbaren löslichen Kollagens.

Der geringe Kollagengehalt des Ausgangsmaterials erfordert den Einsatz großer Gewebemengen für die Isolierung der Kollagentypen $[\alpha 1(I)]_2$ und $[\alpha 1(III)]_3$. Für jüngere Gestationsalter kann die erforderliche Mindestmenge von 1000 mg nicht erreicht werden. Das Poolen sehr vieler Proben wäre unumgänglich, würde die Ergebnisse aber so verfälschen, daß keine Aus-

sagen abgeleitet werden dürften. Deshalb wird sich darauf beschränkt, diese Proben zur Kollagenspaltung ohne die Möglichkeit der getrennten Darstellung der Kollagentypen zu verwenden.

Die 17 auf diese Weise verarbeiteten Proben zeigen mit zunehmender Schwangerschaftsdauer folgende Ergebnisse :

1. Abnahme des Fremdproteinanteils und zunehmend vollständigere Trennung kollagener und nicht-kollagener Anteile nach dem Lyophilisieren des Restes nach Pepsin R₀.

Diese Aussage betrifft vor allem frühe Gestationsalter der pseudoglandulären und kanalikulären Lungenentwicklungsperiode. Außerdem fällt eine Trübung der Kollagenfraktionen beider Entwicklungsstadien nach Cyanogenbromid-Spaltung auf, die bei älteren Feten verschwindet.

2. Anstieg des Kollagengehaltes gemäß der Funktion

$$f(x) = - \frac{40 \times 0,9}{(x - 12)^{1,7}} + 95$$

wobei : x = SSW bzw. Lebensalter in Wochen zuzüglich einer normalen Schwangerschaftsdauer von 40 Wochen

Diese Funktion ist jedoch erst ab der 14. Schwangerschaftswoche gültig und muß im Rahmen weiterführender Arbeiten verifiziert werden.

3. relativ konstante Extrahierbarkeit des Kollagens in % der zur Cyanogenbromid-Spaltung eingesetzten Menge

Angaben über die absolute Extrahierbarkeit des Kollagens in Bezug auf das Ausgangsmaterial unterliegt vielen Fehlerquellen (hohe Verluste im Lau-

fe der umfangreichen Aufarbeitung des Materials bei sehr geringem Kollagengehalt des Lungengewebes) und wird deshalb unterlassen.

4. Proben, die pathologische Veränderungen und einen erhöhten Kollagengehalt des Ausgangsmaterials zeigen, lassen nach Extraktion und Cyanogenbromid-Spaltung keine signifikanten Unterschiede in der Anreicherung des Kollagens im Vergleich mit anderen, unauffälligen Proben erkennen. Sie zeigen jedoch deutliche Abweichungen im Trennungsverhalten, die bereits ausführlich besprochen wurden.

Der andere Teil der Arbeit umfaßt Proben höheren Gestationsalters bzw. Gewebe junger Säuglinge. Die Mindestmenge von 1000 mg für die Isolierung der Kollagentypen I und III kann von vielen Einzelproben erreicht werden. Die Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen :

1. gelungene Trennung kollagener und nicht-kollagener Bestandteile gemäß der höheren Gestationsalter nach Lyophilisieren von R₀.
Die Kollagenfraktionen der Cyanogenbromid-Spaltung zeigen bei $[\alpha 1(\text{III})]_3$ -Kollagen eine braune Verfärbung. Trotzdem sind alle Fraktionen wie die des $[\alpha 1(\text{I})]_2$ -Kollagens klar.
2. Anstieg des Kollagengehaltes und asymptotische Annäherung der Kurve an den Wert + 95 gemäß der Funktion

$$f(x) = - \frac{40 \times 0,9}{(x - 12) 1,7} + 95$$

gültig für beide isolierten Kollagentypen.

Wie vorher beschrieben, ist diese Funktion erst ab der 14. SSW. anwendbar. Postpartal müssen auch hier zur normalen Schwangerschaftsdauer von 40

Wochen die Lebenswochen addiert werden.

Damit entspricht das Ergebnis der Anreicherung des Kollagens nach Cyanogenbromid-Spaltung für beide Kollagentypen I und III den Werten der Kollagenspaltung ohne die Möglichkeit der getrennten Beurteilung dieser Kollagene.

Die im Rahmen dieser Arbeit an anderer Stelle gemachten Einschränkungen für die Gültigkeit der Funktion müssen auch hier berücksichtigt werden.

3. relativ konstante Extrahierbarkeit des Kollagens für beide Kollagentypen $[\alpha 1(I)]_2 \propto 2$ und $[\alpha 1(III)]_3$ nach Cyanogenbromid-Spaltung in % der eingesetzten Menge.

Auch hier wäre eine Bestimmung von Absolutzahlen zur Darstellung der Extrahierbarkeit der Typen in Abhängigkeit vom Ausgangsmaterial mit erheblichen Fehlern belastet.

4. die Berechnung der Mengenrelation der Kollagentypen III und I ($[\alpha 1(III)]_3 : [\alpha 1(I)]_2 \propto 2$) verhält sich im wesentlichen wie 1 : 1 mit einem Streubereich von 0,5 - 2,0.

Deutlich fallen einige Proben aus diesem Bereich heraus. Sie lassen ein verändertes Trennungsverhalten erkennen (vgl. Protokolle und Ergebnisdiskussion der entsprechenden Proben). Auffallend ist, daß es immer zu einer Verschiebung der Mengenrelation zugunsten des Types $[\alpha 1(III)]_3$ kommt. Mögliche Ursachen hierfür sind :

Verlust primär von Typ I-Kollagen im Verlauf der Analyse oder

Fehlen nachweisbaren, typischen Typ I-Kollagens.

Die Proben beider Gruppen werden in Elektrophorese und Densitometrie eingesetzt.

Bei der Aufarbeitung des CB-Materials für die Polyacrylamidgel-Elektrophorese sowie beim Anfärben der Elektrophoresegele mit Coomassie-Brilliant-Blau nach FAIRBANKS (77) treten im Vergleich mit den Untersuchungen fetaler Haut von EWERT (76) signifikante Abweichungen im Verhalten des Probenmaterials auf.

1. Das fetale Lungengewebe läßt sich nicht beliebig oft für die Elektrophorese wieder verwenden. Die Hitzebeständigkeit ist wesentlich geringer als bei der Haut und es kommt bereits nach zweimaligem Aufkochen zu einer Denaturierung und zu einem Verklumpen der CB - Banden. Sie können in diesem Fall nicht mehr dargestellt werden.
2. Die Anfärbbarkeit der Elektrophoresebanden ist deutlich geringer als bei anderen Geweben. Vor allem ein Anfärben der CB 8 - Bande bereitet Schwierigkeiten.

Ein Vergleich der Elektrophoresen der zur Kollagenspaltung eingesetzten Proben zeigt :

einen hohen Fremdproteinanteil der Probe aus der pseudoglandulären Periode, der bereits in der kanalikulären Periode nicht mehr nachweisbar ist,

eine deutliche Vernetzung des Kollagens zwischen den typischen CB - Banden der Proben jüngerer Gestationsalters und

eine zunehmend bessere Darstellbarkeit der CB - Banden mit Fortschreiten der Schwangerschaft.

Der Vergleich der Elektrophoresen der zur Isolierung der Kollagentypen $[\alpha 1(I)]_2 \alpha 2$ und $[\alpha 1(III)]_3$ eingesetzten Proben zeigt neben den dargestellten Schwierigkeiten durch Denaturierung und reduzierte Färbbarkeit eine bessere Darstellung der Bandenmuster durch eine geringere Vernetzung infolge eines höheren Gestationsalters.

Bei drei Proben erscheint eine gelungene Isolierung der Kollagentypen I und III fraglich. Auch mit Elektrophorese und Densitometrie lassen sich die genannten Typen nicht eindeutig nachweisen (vgl. Ausführungen in den Protokollen bzw. der Ergebnisdiskussion der entsprechenden Proben).

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß das fetale Lungengewebe ein äußerst empfindliches Untersuchungsmaterial darstellt, das nach sorgfältiger Präparation einen relativ geringen Kollagengehalt aufweist. Aggressive Extraktionsverfahren und große Mengen an Trockengewicht sind nötig, um die Kollagentypen $[\alpha 1(I)]_2 \alpha 2$ und $[\alpha 1(III)]_3$ zu isolieren.

Die Anreicherung des Kollagens im aufgearbeiteten Material nimmt nach Cyanogenbromid-Spaltung mit steigendem Gestationsalter gemäß der beschriebenen Funktion $f_{(x)}$ zu.

Die Extrahierbarkeit in Prozent der zur Cyanogenbromid-Spaltung eingesetzten Menge bleibt für beide Analyseverfahren relativ konstant und weist auch zwischen den beiden untersuchten Kollagentypen keine signifikanten Unterschiede auf.

Darstellende Verfahren wie Elektrophorese und Densitometrie, die durch eine geringe Anfärbbarkeit der CB - Banden auffallen, verifizieren die Aussagen über Trennungverhalten und erfolgte Isolierung der Kollagentypen I und III und verdeutlichen eindrucksvoll die extreme Empfindlichkeit des fetalen Lungenparenchyms.

7. Literaturverzeichnis :

- 1 Alitalo, K. :
Production of both interstitial and basement membrane
procollagens by fibroblastic Wi-38 cells from human
embryonic lung
Biochem Biophys Res Commun
Vol. 93 1980 Pg. 873 - 880
- 2 Alper, R. , Kerr, J.S. et al :
Relation between reduced alveolar PO₂ and collagen
biosynthesis in the perfused rat lung
J Lab Clin Med
Vol. 99 1982 Pg. 442 - 450
- 3 Al Zaid, N.S. , Bou-Resli, M.N. et al :
Study of the connective tissue of the human fetal
membrane
J Reprod Fertil
Vol. 59 1980 Pg. 383 - 386
- 4 Antonopoulos, C.A. , Gardell, S. et al :
Determination of glycosaminoglycans (mucopolysaccharides)
from tissues on the microgram scale
Biochim Biophys Acta
Vol. 83 1964 Pg. 1
- 5 Anttinen, H. et al :
Prevention by zinc of rat lung collagen accumulation in
carbon tetrachloride injury
Am Rev Respir Dis
Vol. 132 1985 Pg. 536 - 540
- 6 Arey, L.B. :
Development anatomy
Saunders, Philadelphia
Vol. 7 1965 Pg. 104

- 7 Avery, M.E. et al :
The lung and its disorders in the newborn infant
Major Probl Clin Pediatr , 4th edition
Vol. 1 1981 Pg. 1 - 367

- 8 Bailey, A.J. , Robins, S.P. , Balian, G. :
Biological significance of the intermolecular
crosslinks of collagen
Nature
Vol. 251 1974 Pg. 105 - 109

- 9 Ballard, P.L. :
Hormones and receptors in the developing lung
in : Kavlock, R.J. :
Abnormal functional development of the heart, lungs and
kidneys
Approaches to functional teratology
Proceedings of a conference, Asheville, North Carolina
Prog Clin Biol Res
Vol. 40 1983 Pg. 103 - 117

- 10 Bargmann, W. :
Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen
Thieme Verlag, Stuttgart
7. Auflage 1970 Pg. 479 - 492

- 11 Bashey, R.I. , Herold, R. et al :
Biochemical characterization of collagens and of a non-
collagenous protein synthesized by guinea pig lung
fibroblasts in culture
Connect Tissue Res
Vol. 12 1983 Pg. 17 - 31

- 12 Bellamy & Bornstein :
Evidence for procollagen :
a biosynthetic precursor of collagen
Proc Nat Acad Sci
Vol. 68 1971 Pg. 1138 - 1142

- 13 Bender, E. , Silver, F.H. et al :
Type I collagen segment long spacing banding patterns
J Biol Chem
Vol. 257 1982 Pg. 9653 - 9657
- 14 Bender, E. et al :
Type I collagen segment long spacing banding patterns
improved correlation with models using variable
h - spacing
Biopolymers
Vol. 241 1985 Pg. 2195 - 2205
- 15 Benninghoff, A. , Goerttler, K. et al :
Makroskopische und mikroskopische Anatomie des
Menschen Band 2
Urban & Schwarzenberg Verlag
13./14. Auflage 1985 Pg. 310 - 321
- 16 Benya, P.D. :
Two-dimensional CNBr peptide patterns of collagen
types I, II and III
Coll Relat Res
Vol. 1 1981 Pg. 17 - 26
- 17 Bienkowski, R.S. et al :
Degradation of newly synthesized collagen
J Biol Chem
Vol. 253 1978 Pg. 4356 - 4363
- 18 Bienkowski, R.S. et al :
Collagen degradation in the human lung fibroblasts :
extent of degradation, role of lysosomal proteases
and evaluation of alternate hypothesis
J Cell Pathol
Vol. 121 1984 Pg. 152 - 158

- 19 Birk, D.E. , Silver, F.H. :
Collagen fibrillogenesis in vitro :
comparison of types I, II and III
Arch Biochem Biophys
Vol. 235 1984 Pg. 178 - 185

- 20 Blechschmidt, E. :
Die vorgeburtlichen Entwicklungsstadien des Menschen
Karger Verlag, Basel
1. Auflage 1960 Pg. 532 - 539

- 21 Boedtker, H. , Fuller, F. et al :
The structure of collagen genes
Int Rev Connect Tissue Res
Vol. 10 1983 Pg. 1 - 63

- 22 Bornstein, P. :
Disorders of connective tissue
in : Bondy, P.K. :
Duncans Diseases of Metabolism, 6th edition
Saunders 1969 Pg. 654 - 710

- 23 Bornstein, P. :
The biosynthesis of collagen
Annu Rev Biochem
Vol. 43 1974 Pg. 567 - 603

- 24 Bornstein, P. , Sage, H. :
Structurally distinct collagen types
Annu Rev Biochem
Vol. 49 1980 Pg. 957 - 1003

- 25 Bornstein, P. et al :
Regulation of collagen synthesis
Prog Clin Biol Res
Vol. 154 1984 Pg. 61 - 80

- 26 Boyden, E.A. , Tompsett, D.H. :
The changing patterns in the developing lung of infants
Acta Anat
Vol. 61 1965 Pg. 164 - 192
- 27 Boyden, E.A. :
Notes on the development of the lung in infancy and
early childhood
Am J Anat
Vol. 121 1967 Pg. 749 - 762
- 28 Boyden, E.A. :
Development of the human lung
in : Brennerman's practise of pediatrics
Harper and Row
Vol. 4 Pg. 1 - 17
- 29 Bradley, K.H. , McConnell-Breul, S.D. , Crystal, R.G. :
Lung collagen heterogeneity
Proc Natl Acad Sci U.S.A.
Vol. 71 1974 Pg. 2828 - 2832
- 30 Bradley, K.H. , McConnell-Breul, S.D. , Crystal, R.G. :
Lung collagen composition and synthesis :
characterization and changes with age
J Biol Chem
Vol. 249 1974 Pg. 2674 - 2683
- 31 Bradley, K.H. , McConnell-Breul, S.D. , Crystal, R.G. :
Collagen in the human lung :
quantitation of rates synthesis and partial characteriza-
tion of composition
J Clin Invest
Vol. 55 1975 Pg. 543 - 550

- 32 Breul, S.D. , Bradley, K.H. et al :
Control collagen production by human diploid lung
fibroblasts
J Biol Chem
Vol. 255 1980 Pg. 5250 - 5260
- 33 Buddecke, E. :
Pathobiochemie
De Gruyter Verlag, Berlin
1. Auflage 1978 Pg. 331 - 347
- 34 Buddecke, E. :
Grundriß der Biochemie
De Gruyter Verlag, Berlin
6. Auflage 1980 Pg. 513 - 518
- 35 Burgeson, R.E. , Hollister, D. :
Collagen heterogeneity in human cartilage :
identification of several new collagen chains
Biochem Biophys Res
Vol. 87 1979 Pg. 1124 - 1131
- 36 Burgeson, R.E. , Hebda, P. et al :
Human cartilage collagens :
comparison of cartilage collagens with human type
collagen
J Biol Chem
Vol. 257 1982 Pg. 7852 - 7856
- 37 Burri, P.H. :
Fetal and postnatal development of the lung
Ann Rev Physiol
Vol. 46 1984 Pg. 617 - 628
- 38 Byers, P.H. , Barsh, G.S. , Hobbrook, K.A. :
Molecular pathology in inherited disorders of collagen
metabolism
Human Pathol
Vol. 13 1982 Pg. 89 - 95

- 39 Byers, P.H. , Shapiro, J.R. et al :
Abnormal α 2-chains in type I collagen from a patient
with a form of Osteogenesis imperfecta
J Clin Invest
Vol. 71 1983 Pg. 689 - 697
- 40 Cannon, D.J. , Davison, P.F. :
Crosslinking in type III collagen of fetal tissue
Biochem Biophys Res Commun
Vol. 85 1978 Pg. 1373 - 1378
- 41 Carmichel, D.J. , Dodd, C.M. , Veis, A. :
The solubilization of bone and dentin collagens by
pepsin effect of cross-linkages and non-collagen
components
Biochim Biophys Acta
Vol. 491 1977 Pg. 177 - 192
- 42 Castor, W. , Heiss, P.R. et al :
Connective tissue formation by lung fibroblasts in vitro
Am Rev Respir Dis
Vol. 120 1979 Pg. 107 - 119
- 43 Catterton, W.Z. , Escobedo, M.B. , Sexson, W.R. et al :
Effect of epidermal growth factor on lung maturation in
fetal rabbits
Pediatr Res
Vol. 13 1979 Pg. 104 - 108
- 44 Cetta, G. , Tenni, R. , Castellani, A. :
A simple method for quantitative estimation of collagen
type III to type I ratio in soft tissues
Ital J Biochem
Vol. 28 1979 Pg. 163 - 172

- 45 Chan, D. , Cole, W.G. :
Quantitation of type I and III collagens using electrophoresis of α -chains and cyanogen bromide peptides
Anal Biochem
Vol. 138 1984 Pg. 322 - 328
- 46 ChandraRajan, J :
Separation of type III collagen from type I collagen and pepsin by differential denaturation and renaturation
Biochem Biophys Res Commun
Vol. 83 1978 Pg. 180 - 186
- 47 Cheah, K. :
Collagen genes and inherited connective tissue disease
Biochem J
Vol. 229 1985 Pg. 287 - 303
- 48 Chung, E. , Miller, E.J. :
Collagen polymorphism :
characterization of molecules with chain composition
[$\alpha 1(\text{III})$]₃ in human tissues
Science
Vol. 183 1974 Pg. 1200 - 1201
- 49 Chung, E. , Keele, E.E.M. , Miller, E.J. :
Isolation and characterization of cyanogen bromide peptides from $\alpha 1(\text{III})$ -chain of human collagen
Biochemistry
Vol. 13 1974 Pg. 3459 - 3464
- 50 Clark, J.G. , Kuhn, Ch. , Uitto, J. :
Lung collagen in Type IV Ehlers-Danlos-Syndrom :
ultrastructural and biochemical studies
Am Rev Respir Dis
Vol. 122 1980 Pg. 971 - 978

- 51 Clark, J.E. , Kuhn, Ch. , McDonald, J.A. et al :
Lung connective tissue
Int Rev Connect Tissue Res
Vol. 10 1983 Pg. 249 - 331
- 52 Cole, W.G. , Bean, D.A. :
Analysis of collagen bromide peptides using electrophoresis in continuous concave gradient polyacrylamide gels
Anal Biochem
Vol. 92 1979 Pg. 183 - 188
- 53 Collins, J.F. , Jones, M.A. :
Connective tissue proteins of the baboon lung :
concentration, content and synthesis of collagen in the
normal lung
Connect Tissue Res
Vol. 3 1978 Pg. 211 - 215
- 54 Collins, J.F. et al :
Variability in lung collagen amounts after prolonged
support of acute respiratory failure
Chest
Vol. 85 1984 Pg. 641 - 646
- 55 Craig, A.S. et al :
Growth and development of collagen fibrils in immature
tissues from rat and sheep
Proc R Soc London (Biol)
Vol. 212 1981 Pg. 85 - 92
- 56 Cronlund, A.I. et al :
Binding of lysyl oxidase to fibrils of type I collagen
Connect Tissue Res
Vol. 14 1985 Pg. 109 - 119

- 57 Da Costa, H. , Pathak, A. et al :
Developmental defects of the lungs
Eur J Nucl Med
Vol. 6 1981 Pg. 265 - 267
- 58 Daston, G.P. :
Effects of maternal cadmium exposure in the rat of
prenatal maturation of pulmonary surfactant system
in : Kavlock, R.J. :
Abnormal functional development of the heart, lungs
and kidneys
Approaches to functional teratology
Proceedings of a conference, Asheville, North Carolina
Prog Clin Biol Res
Vol. 40 1983 Pg. 143 - 156
- 59 Degenhardt, K.H. :
Humangenetik
Deutscher Ärzte Verlag, Köln 1973
- 60 Deyl, Z. et al :
Chromatographic and electrophoretic methods for colla-
gen separation
Prog Clin Biol Res
Vol. 54 1981 Pg. 15 - 44
- 61 Dickerson, R.E. , Geis, I. :
Struktur und Funktion der Proteine
Verlag Chemie, Weinheim
1. Auflage 1975 Pg. 24 - 43
- 62 Diel, J.H. , Short, R.K. :
Collagen localization in lung parenchyma irradiated by
inhaled $^{234}\text{PuO}_2$ particles
Radiat Res
Vol. 79 1979 Pg. 417 - 423

- 63 Diem, K. , Lentner, C. :
Wissenschaftliche Tabellen
Thieme Verlag, Stuttgart
7. Auflage 1975 Pg. 687 - 688
- 64 Doerr, W. , Blümcke, S. et al :
Pathologie der Lunge Band 1
Springer Verlag, Heidelberg
1. Auflage 1983 Pg. 101 - 124
- 65 Dombi, G.W. et al :
Collagen fibril formation in the presence of sodium
dodecyl sulfate
Biochem J
Vol. 228 1985 Pg. 551 - 556
- 66 Duhamel. R.C. :
Differential staining of collagens and non-collagens
with Coomassie Brilliant Blue G and R
Coll Relat Res
Vol. 3 1983 Pg. 195 - 204
- 67 Duksin, D. , Francis, M.J.O. :
Heritable disorders of collagen metabolism
Tibs No. 638
Tape 1 R.M.
- 68 Dunnill, M.S. :
Postnatal growth of the lung
Thorax
Vol. 17 1982 Pg. 329 - 333
- 69 Dunnill, M.S. :
The problem of lung growth
Thorax
Vol. 37 1982 Pg. 561 - 563

- 70 Epstein, E.H. :
[α 1(III)]₃, human skin collagen, release by pepsin
digestion and preponderance in fetal life
J Biol Chem
Vol. 249 1974 Pg. 3225 - 3231
- 71 Epstein, E.H. , Munderich, N.H. :
Human skin collagen :
presence of type I and type III at all levels of the
dermis
J Biol Chem
Vol. 253 1978 Pg. 1336 - 1337
- 72 Eyre, D.R. , Glimcher, M.J. :
Collagen cross-linking :
isolation of cross-linked peptides from collagen of
chicken bone
Biochem J
Vol. 135 1973 Pg. 393 - 403
- 73 Eyre, D.R. :
Collagen :
structure and synthesis
Scott Med J
Vol. 22 1977 Pg. 85
- 74 Eyre, D.R. :
A biochemical approach for quantifying and localizing
collagen types
Suppl Thromb Haemostas
Vol. 63 1978 Pg. 189 - 201
- 75 Eyre, D.R. :
Collagen :
molecular diversity in the body's protein scaffold
Science
Vol. 207 1980 Pg. 1315 - 1322

- 76 Ewert, E. :
Quantitativer und qualitativer Nachweis von Kollagen
Typ I und Typ III aus Hautproben während der fötalen
Entwicklung
Inaugural-Dissertation
J.W. Goethe-Universität Frankfurt/Main 1983
- 77 Fairbanks, G. , Steck, T.L. , Wallace, D.F. :
Polyacrylamide gel electrophoresis in SDS
Biochemistry
Vol. 10 1971 Pg. 2608
- 78 Fasold, H. :
Die Struktur der Proteine
Chemische Taschenbücher Nr. 12
Verlag Chemie, Weinheim 1973
- 79 Fessler, J.H. et al :
Biosynthesis of collagen
J Cell Biochem
Vol. 28 1985 Pg. 31 - 37
- 80 Fietzek, P.P. , Rauterberg, J. :
Cyanogen bromide peptides of type III collagen :
first sequence analysis demonstrates homology with
type I collagen
Fed Eur Biochem Lett
Vol. 49 1975 Pg. 365 - 368
- 81 Fietzek, P.P. :
Covalent structure of the collagen types :
structural studies of type I, type II and type III
collagen
Suppl Thromb Haemostas
Vol. 63 1978 Pg. 103 - 109

- 82 Finegold, M.J. , Ingwersen-Sciscoe, D. :
Starch in lungs of newborn
Am J Dis Child
Vol. 135 1981 Pg. 671 - 672
- 83 Fitzpatrick, M. , Hospelhorn, V.D. :
Studies of human pulmonary connective tissue :
II. amino acid composition of residues following colla-
genase digestion of lung connective tissues
Am Rev Respir Dis
Vol. 92 1965 Pg. 792 - 800
- 84 Förster, H. , Lacko, L. :
Physiologische Chemie
Enke Verlag, Stuttgart
2. Auflage 1979 Pg. 583 - 592
- 85 Franzblau, C. , Faris, B. :
Elastin :
Cell biology of extracellular matrix
edited by Hay, E.D.
Plenum Press New York
- 86 Fujihara, M. , Ogawa, T. et al :
Amino acid compositions of the components from 6 N HCl-
solubilized collagen
Kitasato Arch Exp Med
Vol. 52 1979 Pg. 27 - 29
- 87 Fujiwara, S. , Nagai, Y. :
Basement membrane collagen from bovine lung :
its chain associations as observed by two-dimensional
electrophoresis
Coll Relat Res
Vol. 1 1981 Pg. 491 - 504

- 88 Furthmayr, H. , Timpl, R. :
Characterization of collagen peptides by sodium dodecyl-
sulfate-polyacrylamide electrophoresis
Anal Biochem
Vol. 41 1971 Pg. 510 - 516
- 89 Gallop, P.M. , Blumenfeld, O.O. , Seifter, S. :
Structure and metabolism of connective tissue proteins
Ann Rev Biochem
Vol. 41 1971 Pg. 617 - 672
- 90 Gay, S. , Müller, P.K. et al
Polymorphie des Kollagens :
neue Aspekte für Struktur und Funktion des Bindegewebes
Hautarzt
Vol. 27 1976 Pg. 196 - 205
- 91 Gay, S. :
Immunhistological studies on collagen type distribution
in tissues
Suppl Thromb Haemostas
Vol. 63 1978 Pg. 171 - 179
- 92 Gay, S. , Miller, E.J. :
What is collagen, what is not
Ultrastruct Pathol
Vol. 4 1983 Pg. 365 - 377
- 93 Genovese, C. , Rowe, D. , Kream, B. :
Construction of DNA sequence complementary to rat $\alpha 1$
and $\alpha 2$ collagen - mRNA and their use in studying the
regulation of type I collagen synthesis by 1,25 dihy-
droxyvitamin D
Biochemistry
Vol. 23 1984 Pg. 6210 - 6216

- 94 Gerard, S. , Puett, D. , Mitchell, W.M. :
Kinetics of collagen fold formation in human type I
procollagen and the effect of disulfide bonds
Biochemistry
Vol. 20 1981 Pg. 1857 - 1865
- 95 Genbačev, O. et al :
Protein synthesis by human fetal lung
Am J Obstet Gynecol
Vol. 139 1981 Pg. 41 - 46
- 96 Gerstenfeld, L. , Beldekas, J.C. et al :
Cell-free translation of calf type III collagen :
effect of magnesium on ribosome movement during
elongation
J Biol Chem
Vol. 258 1983 Pg. 12058-12063
- 97 Gil, J. , Martinez-Hernandes, A. :
The connective tissue of rat lung :
electron immunohistochemical studies
J Histochem Cytochem
Vol. 32 1984 Pg. 230 - 238
- 98 Gluck, L. :
Fetal lung development
Mead Johnson Symposium of Perinatal and Development
Medicine, Evansville
Vol. 14 1978 Pg. 40 - 49
- 99 Goldberg, R.L. , Fuller, G.C. :
Quantitation of collagen in polyacrylamide gels by
fluorescent scanning of MDPF-labeled proteins :
an improvement over densitometric scanning of gels
staining by Coomassie Blue
Anal Biochem
Vol. 90 1978 Pg. 69 - 80

- 100 Goldstein, R.H. , Faris, B. et al :
The fate of newly synthesized lung collagen after endo-
tracheal administration of ¹⁴C-proline to hamsters
Am Rev Respir Dis
Vol. 117 1978 Pg. 281 - 287
- 101 Grant, M.M. , Cutts, N.R. , Brody, J.S. :
Alterations in lung basement membrane during fetal
growth and type 2-cell development
Dev Biol
Vol. 97 1983 Pg. 173 - 183
- 102 Grobler-Rabie, A.F. , Bresner, D.K. et al :
Polymorphism of DNA sequence in the human pro- 2(I)
collagen gene
J Med Genet
Vol. 22 1985 Pg. 182 - 186
- 103 Gross, J. :
Collagen
Sci Am
Vol. 204 1961 Pg. 120 - 130
- 104 Gross, J. :
The regulation of fetal lung development
in : Kavlock, R.J. :
Abnormal functional development of the heart, lungs and
kidneys
Approaches to functional teratology
Proceedings of a conference, Asheville, North Carolina
Prog Clin Biol Res
Vol. 40 1983 Pg. 93 - 102
- 105 Gross, J. :
An essay on biological degradation of collagen :
Cell biology of extracellular matrix
edited by Hay, E.D.
Plenum Press New York

- 106 Gunston, D. :
Growth retarded fetuses and pulmonary maturity
S Afr Med J
Vol. 54 1978 Pg. 493 - 494
- 107 Gylseth, B. et al :
Analysis of fibres in human lung tissue
Br J Ind Med
Vol. 39 1982 Pg. 191 - 195
- 108 Hance, A.J. , Bradley, K.H. :
Lung collagen heterogeneity :
synthesis of type I and type III collagen by rabbit
and human lung cells in culture
J Clin Invest
Vol. 57 1976 Pg. 102 - 111
- 109 Haralson, M.A. , Frey, K.L. , Mitchell, W.M. :
Collagen biosynthesis by cultured Chinese hamster lung
cells :
cell-free synthesis of procollagen -chains
Biochemistry
Vol. 17 1978 Pg. 864 - 868
- 110 Haralson, M.A. , Mitchell, W.M. et al :
Chinese hamster lung cells synthesize and confine to the
cellular domain a collagen composed solely of β -chains
Proc Natl Acad Sci
Vol. 77 1980 Pg. 5206 - 5210
- 111 Haralson, M.A. , Mitchell, W.M. et al :
Evidence that the collagen in the culture medium of
Chinese hamster lung cells contains components related
at the primary structural level in the $\alpha 1(V)$ collagen
chain
Arch Biochem Biophys
Vol. 229 1984 Pg. 509 - 518

- 112 Hay, E.D. , Linsenmayer, T.F. , Trelstadt, R.L. et al :
Origin and distribution of collagens in the developing
avian cornea
Curr Top Eye Res
Vol. 1 1979 Pg. 1 - 35
- 113 Hay, E.D. :
Collagen and embryonic development
Cell biology of extracellular matrix
edited by Hay, E.D.
Plenum Press New York
- 114 Hayashi, T. , Nagai, Y. :
Separation of the alpha-chains of type I and III colla-
gens by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis
J Biochem
Vol. 86 1979 Pg. 453 - 459
- 115 Henkel, W. , Rautenberg, J. , Stritz, I. :
Isolation of a cross-linked cyanogen-bromide peptide
from insoluble rabbit collagen
Eur J Biochem
Vol. 69 1976 Pg. 223 - 231
- 116 Herbage, D. , Bouillet, J. , Bernengo, J.C. :
Biochemical and physicochemical characterization of
pepsin-solubilized type II collagen from bovine
articular cartilage
J Biochem
Vol. 161 1977 Pg. 303 - 312
- 117 Hill, J.R. , Harper, E. :
Quantitation of type I and III collagens in human tissue
samples and cell culture by cyanogen-bromide peptide
analysis
Anal Biochem
Vol. 141 1984 Pg. 83 - 93

- 125 Hurst, D.J. , Kilburn, K.H. , Baker, W.M. :
Normal newborn and adult human lung collagen :
analysis of types
Connect Tissue Res
Vol. 5 1977 Pg. 117 - 125
- 126 Inselmann, L. , Mellind, R.B. :
Growth and development of the lung
J Pediatr
Vol. 98 1981 Pg. 1 - 15
- 127 Jamall, I.S. , Finelli, V.N. et al :
A simple method to determine nanogram levels of
4-hydroxyproline in biological tissues
Anal Biochem
Vol. 112 1980 Pg. 70 - 75
- 128 Junqueira, L.C. , Bignolas, G. et al :
A simple sensitive method for the quantitative estimation of collagen
Anal Biochem
Vol. 94 1979 Pg. 96 - 99
- 129 Kanke, Y. et al :
Biochemistry of collagen :
present knowledge
N.Y. State J Med
Vol. 81 1981 Pg. 1045 - 1052
- 130 Karlson, P. :
Kurzes Lehrbuch der Biochemie
Thieme Verlag, Stuttgart
11. Auflage 1980 Pg. 388 - 390

- 131 Katsuyuki, F. , Tanzer, M. :
Osteogenesis imperfecta :
biochemical studies of bone collagen
Clin Orthopaed
Vol. 124 1977 Pg. 271 - 277
- 132 Kehrer, I.P. :
Analysis of pulmonary collagen production by high performance liquid chromatographic separation of radio-labeled hydroxyproline and proline
Proc Western Pharmacol Soc
Vol. 22 1984 Pg. 319 - 322
- 133 Kelley, J. , Chirin, L. , Evans, J.N. :
Microquantitation of insoluble tissue collagen (types I and III) by radiodilution assay
Anal Biochem
Vol. 139 1984 Pg. 115 - 125
- 134 Kelly, J. , von der Mark, K. et al :
Identification of collagen types I, II, III and V by two-dimensional fingerprinting of ^{125}J -labeled peptides
Anal Biochem
Vol. 112 1981 Pg. 105 - 116
- 135 King, J. , Laemmli, H.K. :
Polypeptides of the tail fibres of bacteriophage T 4
J Mol Biol
Vol. 62 1971 Pg. 465 - 477
- 136 Kirk, J.M. et al :
Quantitation of types I and III collagen in biopsy lung samples from patients with cryptogenic fibrosing alveolitis
Coll Relat Res
Vol. 4 1984 Pg. 169 - 182

- 137 Kitterman, J. :
Fetal lung development
J Dev Physiol
Vol. 6 1984 Pg. 67 - 82
- 138 Kivirikko, K.I. , Savolainen, E.R. :
Genetic disorders of collagen
Med Biol
Vol. 59 1981 Pg. 1 - 6
- 139 Kivirikko, K.I. et al :
Synthesis of collagen :
chemical regulation of post-translational events
Ciba Fdn Symp Amsterdam
Vol. 114 1985 Pg. 34 - 64
- 140 Knapp, A. :
Genetische Stoffwechselstörungen
VEB Fischer Verlag, Jena 1970
- 141 Krane, S.M. , Pinell, S.R. , Erbe, R.W. :
Lysyl-protocollagen hydroxylase deficiency in fibroblasts
from siblings with hydroxylysine-deficient collagen
Proc Nat Acad Sci
Vol. 69 1972 Pg. 2899 - 2903
- 142 Kristić, R.V. :
Ultrastruktur der Säugetierzelle
Springer Verlag, Heidelberg 1976
- 143 Kristić, R.V. :
Das Gewebe des Menschen und der Säugetiere
Springer Verlag, Heidelberg 1978

- 144 Kubo, K. , Takagi, T. :
The $\alpha 1(I)$ and $\alpha 2(I)$ chains of collagen separate in
sodium dodecyl sulfate-polyacrylamid gel electropho-
resis due to differences in sodium dodecyl sulfate
binding capacities
Coll Relat Res
Vol. 4 1984 Pg. 201 - 208
- 145 Kühn, K. :
Structure and biochemistry of collagen
Aesthetic Plast Surg
Vol. 9 1985 Pg. 141 - 144
- 146 Kung, Y.T.K. , Leslie, J.G. :
Polymorphism in human uterine collagen
Connect Tissue Res
Vol. 5 1977 Pg. 127 - 129
- 147 Langmann, J. :
Medizinische Embryologie :
die normale menschliche Entwicklung und ihre Fehlbil-
dungen
Thieme Verlag, Stuttgart
2. Auflage 1974
- 148 Langston, C. , Thurlbeck, W.M. :
Lung growth and development in late prenatal and early
postnatal life
Perspect Pediatr Pathol
Vol. 7 1982 Pg. 203 - 235
- 149 Langston, C. :
Normal and abnormal structural development of the
human lung
in : Kavlock, R.J. :
Abnormal functional development of the heart, lungs and
kidneys
Approaches to functional teratology
Proceedings of a conference, Asheville, North Carolina
Prog Clin Biol Res
Vol. 40 1983 Pg. 75 - 91

- 150 Langston, C. , Kouzi, K. et al :
Human lung growth in late gestation and in the neonate
Am Rev Respir Dis
Vol. 129 1984 Pg. 607 - 613
- 151 Lapiere, Q.M. et al :
Interaction between collagen type I and type III in
conditioning bundless organization
Connect Tissue Res
Vol. 5 1977 Pg. 21 - 29
- 152 Last, J.A. :
Biochemical alterations of lung structure as predictors
of chronic lung disease
Environ Health Perspect
Vol. 52 1983 Pg. 159 - 163
- 153 Last, J.A. , Siefkin, A. , Reiser, K.M. :
Type I collagen content is increased in lungs of pa-
tients with adult respiratory distress syndrome
Thorax
Vol. 38 1983 Pg. 364 - 368
- 154 Last, J.A. , Reiser, K.M. :
Collagen biosynthesis
Environ Health Perspect
Vol. 55 1984 Pg. 169 - 177
- 155 Laurent, G.J. , Cockerhill, P. et al :
A simplified method for quantitation of the relative
amounts of type I and type III collagen in small tissue
samples
Anal Biochem
Vol. 113 1981 Pg. 301 - 312

- 156 Laurent, G.J. :
Collagen metabolism in the normal lung
Curr Probl Clin Biochem
Vol. 13 1983 Pg. 124,- 133
- 157 Lee, Y.C. et al :
Increased pulmonary collagen synthesis in mice treated
with cyclophosphamide
Drug Chem Toxicol
Vol. 8 1985 Pg. 503 - 512
- 158 Lehninger, A.L. :
Biochemie
Verlag Chemie, Weinheim
2. Auflage 1979 Pg. 99 - 123
- 159 Lesot, H. , Ruch, V. :
Analyse des types de collagene synthetises par l'ebauche
dentaire et des constituants dissecies l'embryon de
souris
Biol Cell
Vol. 34 1979 Pg. 23 - 38
- 160 Lichtenstein, J.R. , Martin, G.R. et al :
Defect in conversion of procollagen to collagen in a
form of Ehlers-Danlos-syndrome
Science
Vol. 182 1973 Pg. 298 - 299
- 161 Liggins, C.C. , Kitterman, J.A. :
Development of the fetal lung
in : Elliot, K. & Ehelan, J. :
The fetus and independant life
Ciba Fdn Symp London
Vol. 86 1981 Pg. 308 - 322

- 162 Liggins, C.C. :
Growth of the fetal lung
J Dev Physiol
Vol. 6 1984 Pg. 237, - 248
- 163 Light, N.D. :
Estimation of types I and III collagens in whole tissue
by quantitation of CNBr-peptides on SDS-polyacrylamide
gels
Biochim Biophys Acta
Vol. 702 1982 Pg. 30 - 36
- 164 Linsenmayer, T.F. :
Collagen :
Cell biology and extracellular matrix
edited by Hay, E.D.
Plenum Press New York
- 165 Little, C.D. , Church, R.L. :
A new type of collagen produced by mouse cells derived
from early embryonic sources
Arch Biochem Biophys
Vol. 190 1978 Pg. 632 - 639
- 166 Lubchenko et al :
Normalmaße des intrauterinen Wachstumsalters
Pediatrics
Vol. 32 1963 Pg. 793
- 167 Lubchenko et al :
Normalmaße des intrauterinen Wachstumsalters
Pediatrics
Vol. 37 1966 Pg. 403
- 168 Macek, K. et al :
Separation of collagen types I and III by high perfor-
mance sodium liquid chromatography
J Chromat
Vol. 222 1981 Pg. 284 - 290

- 169 Macek, J. et al :
Methods for rapid determination of hydroxyproline by
high-performance liquid chromatography and its ex-
ploitation for the study of collagen formation
J Chromat
Vol. 374 1986 Pg. 125 - 128
- 170 Madri, J.A. , Furthmayr, H. :
Isolation and tissue localization of type AB₂ collagen
from normal lung parenchyma
Am J Pathol
Vol. 94 1979 Pg. 323 - 331
- 171 Madri, J.A. , Furthmayr, H. :
Collagen polymorphism in the lung :
an immunchemical study of pulmonary fibrosis
Hum Pathol
Vol. 11 1980 Pg. 353 - 366
- 172 Maurer, H.R. :
Disc electrophoresis and related techniques of poly-
acrylamide gel electrophoresis
De Gruyter Verlag, Berlin 1971
- 173 McCullagh, K.A. :
Collagen characterization and cell transformation in
human atherosclerosis
Nature
Vol. 258 1975 Pg. 73 - 75
- 174 McLees, B.D. et al :
Isolation of type III collagen from adult parenchymal
lung tissue
Biochemistry
Vol. 16 1977 Pg. 185 - 190

- 175 Meredith, S.C. et al :
The chromatographic purification of native types I, II
and III collagens
Biochim Biophys Acta
Vol. 668 1981 Pg. 357 - 369
- 176 Miller, A. :
The structure of collagen
Ciba Fdn Symp Amsterdam
Vol. 114 1985 Pg. 65 - 79
- 177 Miller, E.J. , Epstein, E.H. , Piez, K.A. :
Identification of three genetically distinct collagens
by CNBr of insoluble human skin and cartilage collagen
Biochem Biophys Res Commun
Vol. 42 1971 Pg. 1024 - 1029
- 178 Miller, E.J. :
Structural studies on cartilage collagen employing
limited cleavage and solubilization with pepsin
Biochemistry
Vol. 11 1972 Pg. 4903 - 4909
- 179 Miller, E.J. , Lunde, L.C. :
Isolation and characterization of the cyanogen bromide
peptide from the $\alpha 1(\text{II})$ chain of bovine and human
cartilage collagen
Biochemistry
Vol. 12 1973 Pg. 3153 - 3159
- 180 Miller, E.J. :
Biochemical characteristics and biological significance
of the genetically distinct collagens
Mol Cell Biochem
Vol. 13 1976 Pg. 165 - 188

- 181 Miller, E.J. :
Chemistry, structure and localization of different
collagens :
introduction
Suppl Thromb Haemostas
Vol. 63 1978 Pg. 99 - 102
- 182 Miller, E.J. , Gay, S. :
Collagen :
an overview
Methods Enzymol
82 PtA 1982 Pg. 3 - 32
- 183 Miller, E.J. , Rhodes, K.R. :
Preparation and characterization of the different
types of collagen
Methods Enzymol
82 PtA 1982 Pg. 33 - 64
- 184 Miller, E.J. , Rhodes, K.R. , Furuto, D.K. :
Identification of collagen chains as a function of
cyanogen bromide peptide patterns using gel permeation
high-performance liquid chromatography
Coll Relat Res
Vol. 3 1983 Pg. 79 - 87
- 185 Miller, E.J. :
The structure of collagen
Monogr Pathol
Vol. 24 1983 Pg. 4 - 15
- 186 Miller, E.J. :
Recent information on the chemistry of collagens
The Chemistry and Biology of Mineralized Tissues
Vol. 1985 Pg. 80 - 93

- 187 Montes, G.S. , Junqueira, L.C.U. :
Biology of collagen
Rev Can Biol Exp
Vol. 41 1982 Pg. 143 - 156
- 188 Moore, K.L. :
Embryologie
Schattauer Verlag, Stuttgart
1. Auflage 1980 Pg. 193 - 195
- 189 Myers, R.A. et al :
Protein deficiency :
Effects on lung mechanics and the accumulation of
collagen and elastin in the rat lung
J Nutr
Vol. 113 1983 Pg. 2308 - 2315
- 190 Myers, R.A. et al :
Lung collagen and elastin after ozone exposure in
vitamin B-6 deficient rats
Toxicol Lett
Vol. 30 1986 Pg. 55 - 61
- 191 Nakamoto, T. , Porter, J. :
Malnutrition and oxygen at high pressure :
influence on collagen synthesis in lung and heart of
the newborn rat
Aviat Space Environ Med
Vol. 55 1984 Pg. 528 - 533
- 192 Netter et al :
Farbatlanten der Medizin
Band 4 : Atmungsorgane
Thieme Verlag, Stuttgart 1979

- 193 Nicholls, C. , Bailey, A.S. :
Identification of cyanogen bromide peptides involved
in intermolecular cross-linking of bovine type III
collagen
Biochem J
Vol. 115 1980 Pg. 195 - 201
- 194 Nold, J.G. , Kang, A.H. , Gross, J. :
Collagen molecules :
distribution of α -chains
Science
Vol. 170 1970 Pg. 1096 - 1098
- 195 Olsen, B.R. :
Collagen biosynthesis :
Cell biology of extracellular matrix
edited by Hay, E.D.
Plenum Press New York
- 196 Passarge, E. :
Elemente der klinischen Genetik
Fischer Verlag, Stuttgart 1979
- 197 Peltonen, I. et al :
Enzymes converting procollagens to collagens
J Cell Biochem
Vol. 28 1985 Pg. 15 - 21
- 198 Piez, K.A. , Eigner, E.A. , Lewis, M.S. :
The chromatographic separation and amino acid composition of the subunits of several collagens
Biochemistry
Vol. 2 1963 Pg. 58 - 66
- 199 Pinell, S.R. :
The metabolic basis of inherited disorders of collagen
McGraw-Hill-Book Company Chapter 57
4th edition 1978

- 200 Plauché, C. et al :
Phosphatidylglycerol and fetal lung maturity
Am J Obstet Gynecol
Vol. 144 1982 Pg. 167 - 172
- 201 Poole, A. , Myllyla, R. , Wagner, J.C. et al :
Collagen biosynthesis enzymes in lung tissue and
serum of rats with experimental silicosis
Br J Exp Pathol
Vol. 66 1985 Pg. 567 - 575
- 202 Pope, F.M. :
Inherited abnormalities of collagen
J Med Genet
Vol. 18 1981 Pg. 142 - 143
- 203 Pope, F.M. et al :
Type III collagen deficiency with normal phenotype
J R Soc Med
Vol. 76 1983 Pg. 518 - 520
- 204 Prockop, D.J. , Kivirikko, K.I. et al :
The biosynthesis of collagen and its disorders
(first of two parts)
N Engl J Med
Vol. 301 1979 Pg. 13 - 23
- 205 Prockop, D.J. , Kivirikko, K.I. et al :
The biosynthesis of collagen and its disorders
(second of two parts)
N Engl J Med
Vol. 301 1979 Pg. 77 - 85
- 206 Prockop, D.J. :
Genetic defects of collagen
Hosp Pract (Off)
Vol. 21 1986 Pg. 125 - 140

- 207 Ramachandran, G.N. , Basal, M. , Ramakrshnan, C. :
Hydroxyproline stabilizes both intrafibrillar linkages
in collagen
Curr Sci
Vol. 44 1975
- 208 Rapoport, S.M. :
Medizinische Biochemie
VEB Volk und Gesundheit, Berlin
7. Auflage 1977
- 209 Raub, J.A. et al :
Effects of prenatal nitrofen exposure on postnatal lung
function in rat
in : Kavlock, R.J. :
Abnormal functional development of the heart, lungs and
kidneys
Approaches to functional teratology
Proceedings of a conference, Asheville, North Carolina
Prog Clin Biol Res
Vol. 40 1983 Pg. 119 - 134
- 210 Reiser, K.M. , Last, J.A. :
Quantitation of specific collagen types from lungs of
small mammals
Anal Biochem
Vol. 104 1980 Pg. 87 - 98
- 211 Reiser, K.M. , Last, J.A. :
Anomalous electrophoretic behaviour of a CNBr peptide
from type III collagen
Connect Tissue Res
Vol. 12 1983 Pg. 1 - 16
- 212 Remmele et al :
Pathologie I
Springer Verlag, Heidelberg
1. Auflage 1984 Pg. 747 - 750

- 213 Rest, van der , Bennett, H. et al :
Separation of collagen CNBr-derived peptides by
reversed-phase high-performance liquid chromatography
Biochem J
Vol. 191 1980 Pg. 253 - 256
- 214 Richmond, V. :
Increased lability of lung collagen crosslinks
Anal Biochem
Vol. 104 1980 Pg. 277 - 283
- 215 Riso, J. :
Morphology of epithelio-mesenchymal interaction during
lung development of the mouse
Cell Diff
Vol. 13 1983 Pg. 309 - 318
- 216 Robins, S.P. :
Analysis of the crosslinking components in collagen
and elastin
Methods Biochem Anal
Vol. 28 1982 Pg. 329 - 379
- 217 Rojkind, M. :
Chemistry and biosynthesis of collagen
Bull Rheum Dis
Vol. 30 1979/80 Pg. 1006 - 1010
- 218 Rosenquist, Th.R. :
Organization of collagen in the human pulmonary
alveolar wall
Anat Rec
Vol. 200 1981 Pg. 447 - 459
- 219 Ross, R. , Bornstein, P. :
Elastic fibers in the body
Sci Am
Vol. 224 1971 Pg. 44 - 55

- 220 Russell, P.J. :
Genetik
Springer Verlag, Heidelberg 1983
- 221 Schiebler, T.H. , Schmidt, W. et al :
Lehrbuch der gesamten Anatomie des Menschen
Springer Verlag, Heidelberg
3. Auflage 1983
- 222 Scott, P.S. , Telser, A.G. et al :
Semiquantitative determination of CNBr peptides of
collagen in SDS-polyacrylamide gels
Anal Biochem
Vol. 70 1976 Pg. 251 - 257
- 223 Sengbusch, P. :
Molekular- und Zellbiologie
Springer Verlag, Heidelberg 1979
- 224 Seyer, J.M. , Brickley, D.M. et al :
The isolation of two types of collagen from embryonic
bovine epiphysial cartilage
Calif Tissue Res
Vol. 17 1974 Pg. 25 - 41
- 225 Seyer, J.M. , Hutchinson, E.T. et al :
Collagen polymorphism in idiopathic chronic pulmonary
fibrosis
J Clin Invest
Vol. 57 1976 Pg. 1498 - 1507
- 226 Seyer, J.M. , Kang, A.H. et al :
Investigation of type I and type III collagens of the
lung in progressive systemic sclerosis
Arthritis Rheum
Vol. 24 1981 Pg. 625 - 631

- 227 Shoemaker, C.T. , Reiser, K.M. et al :
Elevated ratios of type I/III collagen in the lungs of
chronically ventilated neonates with respiratory
distress
Pediatr Res
Vol. 18 1984 Pg. 1176 - 1180
- 228 Siegel, R. , Byers, P.H. :
Biosynthesis of collagen :
letter
N Engl J Med
Vol. 294 1976 Pg. 556 - 557
- 229 Silver, F.H. , Langley, K.H. , Trelstadt, R.L. :
Type I collagen fibrillogenesis :
initiation via reversible linear growth steps
Biopolymers
Vol. 18 1979 Pg. 2523 - 2535
- 230 Silver, F.H. , Trelstadt, R.L. :
Type I collagen in solution :
structure and properties of fibril fragments
J Biol Chem
Vol. 255 1980 Pg. 9427 - 9433
- 231 Smith, B.T. et al :
Paracrine regulation of lung growth and maturation :
the substrate of normal functional development
in : Kavlock, R.J. :
Abnormal functional development of the heart, lungs and
kidneys
Approaches to functional teratology
Proceedings of a conference, Asheville, North Carolina
Prog Clin Biol Res
Vol. 40 1983 Pg. 135 - 141

- 232 Spooner, B.S. et al :
Collagen involvement in branching morphogenesis of
embryonic lung and salivary gland
Dev Biol
Vol. 77 1980 Pg. 84 - 102
- 233 Stanley , N.N. , Alper, R. et al :
Effects of a molecular change in collagen on lung
structure and mechanical function
J Clin Invest
Vol. 55 1975 Pg. 1125 - 1201
- 234 Starcher, B.C. , Madaras, J.A. , Tepper, A.S. :
Lysyl oxidase deficiency in lung and fibroblasts from
mice with hereditary emphysema
Biochem Biophys Res Commun
Vol. 78 1977 Pg. 706 - 712
- 235 Starck, D. :
Embryologie :
ein Lehrbuch auf allgemein biologischer Grundlage
Thieme Verlag, Stuttgart
3. Auflage 1975
- 236 Stegemann, H. :
Mikrobestimmung von Hydroxyprolin mit Chloramin-T
und p-Dimethylaminobenzaldehyd
Hoppe Seyler's zeitschrift f. Physiologische Chemie
Vol. 311 1958 Pg. 41
- 237 Stengel, H. :
Grundriß der menschlichen Erblehre :
eine Einführung in die Genetik des Menschen
Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart 1980
- 238 Stock, J.W. , Henning, M.C. et al :
Solubilization on intact collagen from hamster and
baboon lung
Anal Biochem
Vol. 110 1981 Pg. 323 - 330

- 239 Stovin, P.G.I. :
Early lung development
Thorax
Vol. 40 1985 Pg. 401 - 404
- 240 Strom, S.C. , Michalopoulos, G. :
Collagen as a substrate for cell growth and differentiation
Methods Enzymol
82 PtA 1982 Pg. 544 - 555
- 241 Stryer, L. :
Biochemie
Vieweg Verlag, Braunschweig
2. Auflage 1979 Pg. 139 - 153
- 242 ✓
Svejcar, J. :
Kollagenbestimmung = Hydroxyprolinbestimmung
Cor et vasa
Vol. 3 1961 Pg. 90
- 243 ✓
Svejcar, J. :
Die Variabilität des Verteilungsmusters der Mucopolysaccharide während der Ontogenese und in normalem und pathologischem adultem Gewebe
Habilitationsschrift, Frankfurt/Main 1969
- 244 ✓
Svejcar, J. , Mohrmann, C. :
Klinische Genetik in der Pädiatrie
2. Symposium in Mainz
Herausgeber : Spranger, J , Tolksdorf, M. :
Thieme Verlag, Stuttgart
1. Auflage 1980 Pg. 54 - 59
- 245 ✓
Svejcar, J. , Mohrmann, C. :
Collagen in skin, cartilage and placenta in human prenatal development
Skeletal Dysplasias
1. Auflage 1982 Pg. 395 - 399

- 246 Sykes, B. , Puddle, B. et al :
The estimation of two collagens from human dermis by
interrupted gel electrophoresis
Biochem Biophys Res Commun
Vol. 72 1976 Pg. 1472 - 1480
- 247 Takehana, Y. , Hayashi, T. et al :
Determination of collagen band positions on polyacryl-
amide gel without staining
Anal Biochem
Vol. 145 1985 Pg. 188 - 191
- 248 Tanaka, S. et al :
Two-dimensional electrophoresis patterns of the CNBr-
peptides of collagen types I, II, III and V
Coll Relat Res
Vol. 1 1981 Pg. 445 - 452
- 249 Tanzer, M.L. :
Cross-linking of collagen
Science
Vol. 180 1973 Pg. 561 - 566
- 250 Ten Have-Opbroek, A.W. :
The development of the lung in mammalia :
an analysis of concepts and findings
Am J Anat
Vol. 162 1981 Pg. 201 - 219
- 251 Thurlbeck, W.M. :
Postnatal human lung growth
Thorax
Vol. 37 1982 Pg. 564 - 571

- 252 Tolstoshev, P. , Haber, R. et al :
Procollagen messenger RNA levels and activity and
collagen synthesis during fetal development of sheep
lung, tendon and skin
J Biol Chem
Vol. 256 1981 Pg. 9672 - 9679
- 253 Traub, W. , Piez, K.A. :
The chemistry and structure of collagen
Advan Prot Chem
Vol. 25 1971 Pg. 243 - 352
- 254 Trelstad, R.L. , Kang, A.H. et al :
Collagen heterogeneity :
high resolution separation of native $[\alpha 1(I)]_2\alpha 2$ and
 $[\alpha 1(II)]$ and their α -chains
J Biol Chem
Vol. 247 1972 Pg. 6469 - 6473
- 255 Trelstad, R.L. , Catanese, V.M. , Rubin, D.F. :
Collagen fractionation :
separation of native types I, II and III by differential
precipitation
Anal Biochem
Vol. 71 1976 Pg. 114 - 118
- 256 Trelstad, R.L. , Lawley, K.R. :
Isolation and initial characterization of human base-
ment membrane collagens
Biochem biophys Res Commun
Vol. 76 1977 Pg. 376 - 384
- 257 Trelstadt, R.L., Carvalho, A. :
Type IV and Type "AB" collagens do not elicit platelet
aggregation or the serotonin release reaction
J Lab Clin Med
Vol. 93 1979 Pg. 499 - 505

- 258 Trombley, L. , Asher, M. , Kelley, J. :
Lung cell population density determines the ratio of
type III to type I collagens
Am Rev Respir Dis
Vol. 123 1981 Pg. 694 - 696
- 259 Vilos, G.A. , McLeod, W.J. et al :
Absence of impaired response of fetal breathing to
intravenous glucos is associated with pulmonary
hypoplasia in congenital myotonic dystrophy
Am J Obstet Gynecol
Vol. 148 1984 Pg. 558
- 260 Vogel, F. :
Lehrbuch der allgemeinen Humangenetik
Springer Verlag, Heidelberg 1961
- 261 Vogel, K.G. , Peterson, D.W. :
Extracellular, surface and intracellular proteoglycans
produced by human embryonic lung fibroblasts in
culture
J Biol Chem
Vol. 256 1981 Pg. 13235-13242
- 262 Vuust, J. , Abildstein, D. , Lund, T. :
Control of type I collagen synthesis :
evidence for pretranslational coordination of pro- α 1(I)
and pro- α 2(I)-chain synthesis in embryonic chick bone
Connect Tissue Res
Vol. 11 1983 Pg. 185 - 191
- 263 Vuust, J et al :
Regulation of type I collagen synthesis :
total pro- α 1(I) and pro- α 2(I) in RNA's are maintained
in a 2 : 1 ratio under varying rates of collagen
synthesis
Eur J Biochem
Vol. 151 1985 Pg. 449 - 453

- 264 Weadok, K. , Olsen, R. et al :
Evaluation of collagen crosslink techniques
Biomat Med Dev Artif Organs
Vol. 11 1983/84 Pg. 293,- 318
- 265 Weber, L. , Meigel, N.N. , Rauterberg, J. :
SDS-polyacrylamide gel electrophoretic determination of
type I and type III collagen in small skin samples
Dermat Res
Vol. 258 1977 Pg. 251 - 257
- 266 Wigglesworth, J.S. , Desai, R. Querrini, P. :
Fetal lung hypoplasia :
biochemical and structural variations and their
possible significance
Arch Dis Childh.
Vol. 56 1981 Pg. 605 - 615
- 267 Wigglesworth, J.S. , Desai, R. :
Is fetal respiratory function a major determinant of
perinatal survival ?
Lancet
Vol. 1982 Pg. 263 - 267
- 268 Williams, I.F. , McCullagh, K.G. et al :
The distribution of types I and III collagen and fibro-
nectin in the healing equine tendon
Connect Tissue Res
Vol. 12 1984 Pg. 211 - 227
- 269 Witschi, H.P. , Tryka, A.F. et al :
The many faces of an increase in lung collagen
Fundament Applied Toxicol
Vol. 5 1985 Pg. 240 - 250

270 Young, C.D. et al :

Connective tissue arrangement in respiratory airways

Anat Rec

Vol. 198

1980

Pg. 245 - 254

Lebenslauf

Persönliche Daten :

Name	:	Menke
Vorname	:	<u>Sabine</u> , Jutta
Geburtsdatum	:	10. März 1958
Geburtsort	:	Kassel
Adresse	:	Gather Landstraße 75 2260 Niebüll
Heimatadresse	:	Gartenstraße 5 6104 Seeheim-Jugenheim
Eltern	:	Prof. Dipl. Biol. Hans-Joachim Menke Realschullehrerin Erika Menke, geb. Hellmann

Ausbildung :

a) Schulbesuche :

1965 - 1968	Besuch der Grundschule des Schuldorfes Bergstraße in Seeheim-Jugenheim
1968 - 1975	Besuch des Goethe-Gymnasiums in Bensheim/ Bergstraße
1975 - 1978	Besuch der gymnasialen Oberstufe im Schuldorf Bergstraße, Gesamtschule des Kreises Darmstadt-Dieburg
Juni 1978	Abitur
Oktober 1978 bis Oktober 1979	Ausbildung zur medizinisch-technischen Assistentin an der Dr. Lobe-Schule in Wiesbaden

b) Studium :

April	1979	Immatrikulation an der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt/Main Beginn des Studiums der Humanmedizin
August	1981	Ärztliche Vorprüfung
März	1983	1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
März	1985	2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
April	1986	3. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
Mai	1986	Approbation

c) Prktische Erfahrung :

Juli/August	1979	Krankenpflegedienst im St. Rochus-
Februar/März	1980	Krankenhaus Mainz-Mombach
Februar/März	1982	Famulatur im St. Rochus-Krankenhaus Mainz-Mombach im Fach Gynäkologie und Geburtshilfe unter Leitung von Herrn Dr. med. R. Manneh
September	1982	Famulatur in Allgemeinmedizin unter Leitung von Frau Dr. med. I. Wiegand in Bonn-Bad Godesberg
Februar/März	1983	Famulatur in operativer Gynäkologie und Geburtshilfe im St. Rochus-Kranken- haus Mainz-Mombach unter Leitung von Herrn Dr. med. R. Manneh
August	1983	Auslandsfamulatur am Kilimanjaro Christian Medical Centre, Consultant Hospital of Tanzania im Fach Gynäkolo- gie und Geburtshilfe unter Leitung von Herrn Dr. med. Semiono in Moshi, Tanzania
April bis März	1985 1986	Praktisches Jahr im St. Josefs-Hospital, Wiesbaden mit dem Wahlfach Gynäkologie und Geburtshilfe unter Leitung von Herrn Prof. Dr. med. Mosler

d) Weiterbildung :

Oktober	1986	Beginn der Weiterbildung zum Arzt für Gynäkologie und Geburtshilfe am Kreis- krankenhaus Niebüll unter Leitung von Herrn Chefarzt Dr. med. J. Lemke
---------	------	---

Wissenschaftliche Arbeiten :

Februar	1978	Teilnahme am Wettbewerb "Jugend forscht 78" im Fachbereich Biologie mit dem Thema : "Berechnung der Leistungsfähigkeit des kardio-pulmonalen Systems auf der Grund- lage leicht zugänglicher Parameter"
---------	------	---

Niebüll, d. 26. 1. 82

Sabine Menke

(Sabine Menke)

EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG :

Ich erkläre ehrenwörtlich, daß ich die dem Fachbereich Humanmedizin zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel

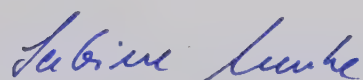
QUALITATIVER NACHWEIS UND VERÄNDERUNG DER
RELATIVEN ZUSAMMENSETZUNG DER KOLLAGENTY-
PEN I UND III IN DER MENSCHLICHEN LUNGE
IN ABHÄNGIGKEIT IHRER ENTWICKLUNG VON DER
PSEUDOGLANDULÄREN PERIODE BIS ZUM 4. LE-
BENS MONAT

im Institut für Humangenetik des Klinikums
der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main
unter Leitung von Herrn Prof. Dr. med. J. Švejcár[✓]
mit Unterstützung durch Frau Chr. Mohrmann
ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung
der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführ-
ten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- und ausländischen Medizinischen
Fakultät bzw. Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promo-
tion eingereicht, noch die vorliegende Arbeit als Dissertation
vorgelegt.

Vorliegende Arbeit wurde bisher in keinem Publikationsorgan
veröffentlicht.

Niebuß, den 26.1.1987



Sabine Menke

